

TOME XIV. (N. S.)

ANNÉE 1948.

Série Pathologie Végétale. — Mémoire n° 5.

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

# ANNALES DES ÉPIPHYTIES

ORGANE DES STATIONS ET LABORATOIRES DE RECHERCHES

RECHERCHES

SUR

LA CULTURE ASSOCIÉE DE PARASITES OBLIGATOIRES  
ET DE TISSUS VÉGÉTAUX

PAR

G. MOREL,

Docteur ès sciences,

Maître de Recherches à la Station centrale de pathologie végétale.

*Rédaction et échanges* : Centre National de la Recherche Agronomique,  
route de Saint-Cyr, Versailles (S.-et-O.).

*Abonnements* : Imprimerie Nationale, 27, rue de la Convention, Paris (xv\*).

PARIS

IMPRIMERIE NATIONALE



# ANNALES DES ÉPIPHYTIES

ORGANE DES STATIONS ET LABORATOIRES DE RECHERCHES.

---

## RÉDACTEURS EN CHEF :

G. ARNAUD,  
Directeur de la Station centrale  
de Pathologie végétale.

B. TROUVELOT,  
Directeur de la Station centrale  
de Zoologie agricole.

## SECRÉTAIRES DE LA RÉDACTION :

J. D'AGUILAR,  
Station centrale de Zoologie agricole.

H. DARPOUX,  
Station centrale de Pathologie végétale.

---

## MÉMOIRES PARUS DU TOME XIV.

ANNÉE 1948.

---

### *Série Entomologie :*

1. J. GIBAN. — Essai sur Rat blanc de quelques colorants dinitrés comme 'poison d'ingestion.
2. J. D'AGUILAR, P. ALLEGRET et R. VASSEUR. — Premières observations sur des parasites du pou de San-José (*Quadraspidiolus perniciosus* Comst.) dans le Lyonnais.
3. A. HOFFMANN. — Les Otiorrhynques de la faune française nuisibles à l'agriculture.
4. R. VASSEUR et D. SCHVESTER. — Le Xylébore disparate (*Xyleborus dispar* F.) dans la région lyonnaise. Première étude.

### *Série Pathologie Végétale :*

1. H. DARPOUX et A. VUITTENEZ. — Essais de traitements contre la tavelure du Poirier.
  2. J. GRENTE. — Influence des attaques de Mort-Lin sur le rendement du Lin cultivé. I. Influence sur le rendement en fibres.
  3. M. VINOT et P. BERNAUX. — La pourriture charbonneuse de la pomme de terre dans la région méditerranéenne (*Macrophomina phaseoli* [MAUBLANC] ASHEY).
  4. P. SÉLARIES. — Sensibilité des différentes variétés de pommes de terre à la maladie verruqueuse (*Synchytrium endobioticum* [SCHILB.] PERC.).
  5. G. MOREL. — Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux.
-

# RECHERCHES

## SUR

### LA CULTURE ASSOCIÉE DE PARASITES OBLIGATOIRES

### ET DE TISSUS VÉGÉTAUX <sup>(1)</sup>

par Georges MOREL,  
Docteur ès sciences,  
Maître de Recherches à la Station centrale de Pathologie végétale.

#### SOMMAIRE :

|                                                    | Pages. |
|----------------------------------------------------|--------|
| INTRODUCTION.....                                  | 127    |
| CHAPITRE I. — HISTORIQUE.....                      | 131    |
| CHAPITRE II. — MATÉRIEL.....                       | 134    |
| CHAPITRE III. — CULTURE DE TISSUS.....             | 137    |
| A. TECHNIQUES GÉNÉRALES.....                       | 137    |
| I. <i>Milieu de culture</i> .....                  | 137    |
| II. <i>Prélèvement aseptique des tissus</i> .....  | 138    |
| a. <i>Tiges aériennes de faible diamètre</i> ..... | 139    |
| b. <i>Tissu cambial d'arbres</i> .....             | 139    |
| c. <i>Racines de faible diamètre</i> .....         | 140    |
| d. <i>Tissus de Crown-Gall</i> .....               | 140    |
| III. <i>Repiquages</i> .....                       | 141    |
| a. <i>Repiquage de la culture primitive</i> .....  | 142    |
| b. <i>Repiquage d'une souche</i> .....             | 143    |
| IV. <i>Techniques anatomiques</i> .....            | 143    |
| a. <i>Fixation</i> .....                           | 143    |
| b. <i>Coloration</i> .....                         | 144    |

<sup>(1)</sup> Ce mémoire constitue la Thèse de doctorat ès sciences naturelles soutenue par G. MOREL le 16 juin 1948 devant la Faculté des Sciences de l'Université de Paris.

|                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| B. DÉVELOPPEMENT DE FRAGMENTS D'ORGANES ISOLÉS.....                          | 144 |
| I. Développement de fragments de tiges de Lianes.....                        | 144 |
| a. Ampélidées.....                                                           | 145 |
| I. Genre <i>Vitis</i> : <i>Vitis vinifera</i> .....                          | 145 |
| II. Genre <i>Parthenocissus</i> .....                                        | 150 |
| 1. <i>Parthenocissus tricuspidata</i> .....                                  | 151 |
| 2. <i>Parthenocissus quinquefolia</i> .....                                  | 154 |
| III. Genre <i>Cissus</i> .....                                               | 154 |
| 1. <i>Cissus incisa</i> .....                                                | 155 |
| 2. <i>Cissus discolor</i> .....                                              | 155 |
| b. Rosacées.....                                                             | 157 |
| I. Genre <i>Rubus</i> .....                                                  | 157 |
| 1. <i>Rubus fruticosus</i> .....                                             | 157 |
| 2. <i>Rubus kinashii</i> .....                                               | 158 |
| 3. <i>Rubus reflexus</i> .....                                               | 159 |
| II. Genre <i>Rosa</i> : <i>Rosa wichuraiana</i> .....                        | 160 |
| c. Lianes diverses.....                                                      | 160 |
| II. Développement de fragments de tissus ou d'organes d'arbres.....          | 161 |
| I. <i>Crataegus monogyna</i> .....                                           | 161 |
| II. <i>Pyrus communis</i> (Var. « Conférence »).....                         | 163 |
| III. <i>Syringa vulgaris</i> (Var. « M <sup>me</sup> Florent Stepman »)..... | 164 |
| III. Développement de fragments d'organes de plantes herbacées.....          | 167 |
| I. <i>Antirrhinum majus</i> .....                                            | 167 |
| II. Malvacées.....                                                           | 168 |
| 1. <i>Malva sylvestris</i> .....                                             | 168 |
| 2. <i>Althea</i> .....                                                       | 170 |
| III. <i>Nicotiana Tabacum</i> .....                                          | 172 |
| C. CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES TISSUS REPIQUÉS.....                              | 175 |
| I. Tissus de lianes.....                                                     | 175 |
| 1. <i>Vitis vinifera</i> .....                                               | 175 |
| a. Tissus normaux.....                                                       | 175 |
| b. Tissus sensibilisés.....                                                  | 176 |
| c. Tissus accoutumés.....                                                    | 178 |
| 2. <i>Parthenocissus tricuspidata</i> .....                                  | 179 |
| a. Tissus sensibilisés.....                                                  | 179 |
| b. Tissus accoutumés.....                                                    | 182 |
| 3. <i>Parthenocissus quinquefolia</i> .....                                  | 183 |
| 4. <i>Cissus incisa</i> .....                                                | 184 |
| 5. <i>Cissus discolor</i> .....                                              | 184 |
| 6. <i>Rubus fruticosus</i> .....                                             | 184 |
| II. Tissus d'arbres.....                                                     | 185 |
| 1. <i>Crataegus monogyna</i> .....                                           | 186 |
| 2. <i>Pyrus communis</i> .....                                               | 188 |
| 3. <i>Syringa vulgaris</i> .....                                             | 188 |
| III. Tissus de plantes herbacées.....                                        | 190 |
| 1. <i>Antirrhinum majus</i> .....                                            | 190 |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2. <i>Malva sylvestris</i> .....                                                                                              | 191 |
| a. Souche rhizogène.....                                                                                                      | 191 |
| b. Souche non rhizogène.....                                                                                                  | 192 |
| 3. <i>Althea</i> .....                                                                                                        | 193 |
| 4. <i>Nicotiana Tabacum</i> .....                                                                                             | 194 |
| a. Tissus normaux.....                                                                                                        | 194 |
| b. Tissus accoutumés.....                                                                                                     | 194 |
| D. CULTURES DE TISSUS DE CROWN-GALL.....                                                                                      | 195 |
| I. Culture de tissus de Crown-Gall de <i>Vitis vinifera</i> .....                                                             | 195 |
| II. Culture de tissus de Crown-Gall d' <i>Abutilon avicennae</i> .....                                                        | 196 |
| III. Culture de tissus de Crown-Gall de <i>Nicotiana Tabacum</i> .....                                                        | 198 |
| CHAPITRE IV. — CULTURES ASSOCIÉES DE TISSUS VÉGÉTAUX ET DE PARASITES OBLIGATOIRES.....                                        | 200 |
| A. CULTURE DU MILDIOU DE LA VIGNE.....                                                                                        | 201 |
| I. Caractères généraux du Mildiou.....                                                                                        | 201 |
| II. Isolement aseptique du champignon.....                                                                                    | 201 |
| III. Inoculation des cultures.....                                                                                            | 202 |
| IV. Invasion des cultures et mode de développement du Mildiou.....                                                            | 203 |
| V. Repiquage du Mildiou.....                                                                                                  | 204 |
| VI. Développement sur différentes espèces de Vigne.....                                                                       | 205 |
| VII. Tentatives de culture sur des milieux inertes.....                                                                       | 206 |
| 1. Milieux naturels.....                                                                                                      | 206 |
| 2. Milieux synthétiques.....                                                                                                  | 207 |
| B. CULTURE DE L'OÏDIUM DE LA VIGNE.....                                                                                       | 207 |
| I. Caractères généraux de l'Oïdium.....                                                                                       | 207 |
| II. Isolement aseptique du champignon et inoculation.....                                                                     | 208 |
| III. Développement du champignon <i>in vitro</i> .....                                                                        | 208 |
| IV. Repiquages.....                                                                                                           | 209 |
| C. TENTATIVES DE CULTURES D'URÉDINÉES.....                                                                                    | 209 |
| I. Essais de culture de <i>Kuehneola albida</i> .....                                                                         | 209 |
| II. Essais de culture de <i>Puccinia antirrhini</i> .....                                                                     | 211 |
| III. Essais de culture de <i>Puccinia malvacearum</i> .....                                                                   | 212 |
| IV. Essais de culture de <i>Gymnosporangium clavariaeforme</i> .....                                                          | 212 |
| D. CULTURES DE VIRUS.....                                                                                                     | 214 |
| I. Généralités.....                                                                                                           | 214 |
| II. Essais préliminaires.....                                                                                                 | 215 |
| III. Culture du virus de la Mosaïque du Tabac.....                                                                            | 215 |
| 1. Culture sur tissu normal.....                                                                                              | 215 |
| 2. Culture sur tissu accoutumé.....                                                                                           | 215 |
| 3. Culture sur tissu de Crown-Gall.....                                                                                       | 216 |
| 4. Inoculation du virus aux cultures.....                                                                                     | 216 |
| 5. Étude comparative de la multiplication du virus dans les tissus cultivés <i>in vitro</i><br>et dans la plante entière..... | 217 |
| IV. Culture du virus X de la Pomme de terre.....                                                                              | 217 |
| 1. Culture sur tissu normal.....                                                                                              | 218 |
| 2. Culture sur tissu de Crown-Gall.....                                                                                       | 218 |
| 3. Culture sur tissu de <i>Jusquiame</i> .....                                                                                | 218 |
| V. Culture du virus Y de la Pomme de terre.....                                                                               | 219 |

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| CHAPITRE V. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES ET CONCLUSIONS.....                 | 220 |
| A. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA CULTURE DES TISSUS.....                 | 220 |
| B. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA CULTURE DES PARASITES OBLIGATOIRES..... | 226 |
| 1° Cultures de champignons parasites.....                                  | 226 |
| 2° Cultures de virus.....                                                  | 228 |
| C. CONCLUSIONS.....                                                        | 229 |

## INTRODUCTION.

La plupart des microorganismes échappent à l'examen direct; leur taille insignifiante, leur infinie variété et leur étonnante faculté de pullulation empêchent en effet de les observer isolément et de les étudier avec précision; pour y parvenir il faut donc les séparer du milieu complexe dans lequel ils vivent normalement et obtenir leur développement à l'état de pureté en colonies individualisées. Cette nécessité de réaliser des cultures *in vitro* fut comprise pour la première fois par PASTEUR et toute la microbiologie naquit de ses premiers travaux. Ce sont ses techniques qui, perfectionnées peu à peu, ont donné à cette science toute l'ampleur qu'elle possède aujourd'hui. Il est cependant des cas où les méthodes pastoriennes sont en défaut. En effet, certains microorganismes pathogènes sont si étroitement associés aux espèces qu'ils infectent que l'on ne parvient pas à les en séparer et à les faire croître et se reproduire en dehors de leur hôte normal. On a donné à ces êtres le nom de parasites stricts ou obligatoires.

La pathologie végétale abonde en exemples de ce genre. Des ordres entiers de Champignons, par exemple les Urédinales, les Chytridiales ou de vastes familles comme les Érysiphacées ou les Péronosporacées, sont exclusivement composés d'espèces strictement parasites. Leur étude physiologique est très difficile car le pathologiste qui désire l'entreprendre doit se contenter d'attendre que des conditions favorables lui permettent de les observer dans la nature. Il ne peut en disposer à sa guise; il est incapable d'étudier expérimentalement leur virulence, leurs modalités d'infection, les conditions de leur développement. Ces inconvénients expliquent les nombreuses tentatives faites pour cultiver *in vitro* ces Champignons suivant des méthodes analogues à celles que l'on utilise pour les espèces susceptibles de vivre en saprophytes.

Les premières tentatives ont consisté à essayer de cultiver ces parasites sur le suc cellulaire ou le protoplasme des plantes qui leur servent d'hôte. Pour cela, on a essayé de les ensemercer sur des extraits divers tels que des tissus broyés, des filtrats, des macérations d'organes, etc., mais ce fut en vain. Tout se passe, en effet, comme si les composants de la cellule végétale subissaient, au moment de la mort, des altérations qui les rendent inutilisables pour les parasites qu'ils nourrissent normalement. D'autres essais réalisés avec des milieux synthétiques n'ont pas été plus fructueux.

Les chercheurs ont donc été réduits à cultiver ces parasites obligatoires sur des plantes entières ou sur des organes détachés, feuilles, rameaux, tubercules. Or, ces organes surtout lorsqu'ils sont infectés par un parasite s'altèrent rapidement et, de plus, on ne peut en disposer que pendant la belle saison, ce qui limite les possibilités de l'expérimentation. Mais cette dernière difficulté peut être éludée par la réalisation de cultures d'organes et de tissus.

L'application de cette méthode à la pathologie a été inaugurée par les physiologistes travaillant sur les tissus animaux. A la suite des travaux de CARREL, de nombreux chercheurs ont en effet essayé de faire vivre divers agents pathogènes sur des tissus cultivés *in vitro*. Ils ont pu cultiver de cette manière diverses bactéries comme le bacille de Koch, la bactérie de la Lèpre, celle de la Diphtérie, de la Typhoïde. Le principal

but de leurs recherches n'était d'ailleurs pas la culture de ces agents pathogènes qui ne sont pas des parasites obligatoires, mais l'étude des réactions des cellules animales à leur égard. Par la suite, la culture des tissus animaux a servi pour obtenir le développement *in vitro* de certains virus que l'on ne peut cultiver autrement; grâce à cette technique on a pu obtenir le développement du virus de la Poliomyélite, ou de ceux de la Rage, de l'Herpès, de la Vaccine, etc. L'application de ces principes au règne végétal aurait dû permettre d'obtenir des résultats analogues. Malheureusement, pendant fort longtemps, toutes les tentatives effectuées pour cultiver des tissus végétaux n'ont abouti qu'à des échecs, si bien que la méthode des cultures associées était inapplicable à la pathologie végétale. Ce n'est qu'au cours de ces dernières années que ROBBINS et WHITE ont réalisé la culture indéfinie de racines isolées et que les travaux de GAUTHERET, de NOBÉCOURT et de WHITE ont conduit à la culture indéfinie de tissus végétaux permettant d'obtenir, en toute saison, des cellules vivantes en pleine activité sur lesquelles on pouvait espérer cultiver les parasites obligatoires. Une voie nouvelle s'ouvrait donc pour l'étude de ces agents pathogènes et nous avons tenté de l'exploiter.

Nous avons en effet cherché à appliquer la technique des cultures de tissus à quelques parasites des plantes. Nous avons tout d'abord songé aux parasites de la vigne en raison de leur grand intérêt agronomique. Le plus redoutable est le Mildiou, champignon de la famille des Péronosporacées, qui se propage avec la plus grande rapidité et peut en quelques jours détruire la plus grande partie de la récolte de toute une région. Les moyens de traitements par les produits cupriques sont loin d'être parfaits; certaines années la récolte est considérablement réduite, aussi cette maladie demeure-t-elle la préoccupation majeure des viticulteurs. Il n'est pas douteux qu'une meilleure connaissance de la nutrition du champignon et de ses relations parasitaires avec la vigne doive fournir des moyens de le combattre plus efficacement. Nous avons aussi considéré une autre maladie de la vigne à évolution moins soudaine, l'Oidium, causée par un champignon de la famille des Érysiphacées, qui est également un parasite obligatoire.

Nous avons pensé qu'il serait également intéressant d'étendre cette méthode des cultures associées à d'autres groupes de champignons parasites, aux Urédinales par exemple. Les Urédinales sont tous des parasites stricts et, en général, étroitement spécialisés. Chaque espèce ne se développe que sur un seul végétal, parfois même une seule variété. Cette spécificité remarquable rendait ces tentatives particulièrement intéressantes.

Nous avons enfin pensé que les cultures de tissus végétaux devaient permettre d'obtenir *in vitro* la multiplication des protéines virus, ces agents pathogènes si particuliers qui provoquent chez les plantes des maladies contagieuses connues autrefois sous le nom de maladies de dégénérescence et qu'on attribuait alors à une mystérieuse sénescence de l'espèce. L'étiologie de ces affections est l'un des chapitres les plus étonnants de toute la biologie moderne. Ces agents contagieux furent d'abord considérés comme des microbes invisibles, des inframicrobes, puis on montra que certains d'entre eux, le virus de la Mosaïque du Tabac par exemple, pouvaient être précipités comme une protéine et même cristalliser sans perdre leur activité, ce qui conduisit à les considérer comme plus voisins de certains protides que des êtres organisés. Il n'est guère surprenant que l'on ne soit jamais parvenu à cultiver ces parasites sur des milieux inertes, car il semble bien que leur multiplication exige la participation active des cellules de la plante dont ils constituent en quelque sorte des produits de dévia-

tion du métabolisme normal. On ne peut donc envisager leur culture qu'en les associant à des cellules vivantes. Cette culture associée de virus et de tissus a déjà été réalisée à plusieurs reprises. C'est ainsi que le physiologiste américain WHITE utilisa des racines de Tomate pour cultiver le virus de la Mosaïque du Tabac (75). Il inoculait la maladie à de jeunes plantes, puis, lorsqu'elles présentaient les symptômes caractéristiques, il sectionnait les tiges et les plaçait en atmosphère humide, afin de leur faire produire des racines adventives. Il cultivait alors ces racines et constatait que le virus continuait à se multiplier au cours des repiquages successifs effectués selon sa technique classique. SEGRÉTAİN entreprit des expériences analogues en utilisant des cultures de tissus de Tabac comme support du virus (67, 68). Cet auteur réussit à inoculer le virus de la Mosaïque du Tabac à des fragments de tige cultivés *in vitro*. Nous avons étendu cette méthode à deux des virus qui causent les maladies de dégénérescence de la Pomme de terre, le virus X et le virus Y.

Le problème posé par ces tentatives de culture de parasites obligatoires était double. Il fallait tout d'abord cultiver les tissus de l'espèce contaminée par le parasite, puis réaliser leur infection. Le premier problème était lui-même difficile, car à l'époque où nous avons commencé nos recherches, on ne savait maintenir en survie indéfinie que des tissus de plantes possédant des organes charnus comme la Carotte, la Scorsonère, le Topinambour, ou bien encore certains tissus tumoraux. Les tissus d'espèces ligneuses comme la Vigne, sur lesquels nous désirions cultiver le Mildiou, ou ceux de diverses espèces herbacées parasitées par des Urédinées, n'avaient fait l'objet d'aucune tentative.

Quant à la seconde question, c'est-à-dire la réalisation de cultures associées, elle-même était encore complètement inexplorée, à l'exception des deux tentatives de WHITE et de SEGRÉTAİN signalées plus haut. Notre travail comprendra donc deux parties : la première sera une contribution au problème général de la culture des tissus végétaux, la seconde une application de cette technique à la Pathologie végétale.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous tenons tout d'abord à exprimer notre plus vive gratitude à M. R. J. GAUTHERET, Professeur à la Sorbonne, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous enseigner lui-même les délicates techniques qu'il a imaginées et qui lui ont permis de réaliser pour la première fois la culture des tissus végétaux. Il n'a cessé, au cours des mois que nous avons passés dans son laboratoire, de nous prodiguer ses conseils d'autant plus précieux que ses travaux font autorité parmi les biologistes du monde entier. Nous ne saurions trop l'en remercier.

Nous remercions aussi bien vivement M. le Professeur PLANTEFOL de l'honneur qu'il nous a fait d'accepter la présidence de notre Jury. Nous tenons également à exprimer toute notre gratitude à M. le Professeur MANGENOT pour l'intérêt qu'il a témoigné à nos travaux. Nous ne saurions non plus oublier que nos premières recherches ont été effectuées à l'Institut national agronomique dans le laboratoire de M. le Professeur J. LEFÈVRE; les conseils qu'il nous a donnés, appuyés par sa profonde connaissance de la Biologie végétale, ont eu une grande influence sur notre orientation.

Nous n'aurions pu mener à bien ce travail si nous n'avions trouvé la situation matérielle qui nous a permis de nous y consacrer, aussi nous tenons spécialement à témoigner notre reconnaissance à M. A. DEMOLON, membre de l'Institut et à M. Ch. CRÉPIN, Directeur de l'Institut de la Recherche agronomique qui, après notre nomination de chef de travaux au Centre de Recherches agronomiques, nous ont accordé toute facilité pour poursuivre ces études. Durant ces années, M. M. RAUCOURT, Directeur du laboratoire de phytopharmacie, nous a constamment déchargé de toute besogne administrative et matérielle et

n'a cessé de nous encourager; il a en outre assumé une part considérable dans la publication de ce mémoire; aussi tenons-nous à lui exprimer tout spécialement notre gratitude.

Il nous est également particulièrement agréable de remercier nos collègues de la Station centrale de Pathologie végétale, tout d'abord son Directeur, M. P. LIMASSET, l'un des rares spécialistes en France des maladies à Virus, qui a bien voulu mettre à notre disposition le matériel nécessaire à nos cultures, puis M<sup>lle</sup> AUGIER DE MONTGEMIER qui a accepté la tâche délicate de rechercher et de doser les Virus contenus dans les cultures de tissus. Nous ne saurions oublier non plus que c'est à la Station centrale de Pathologie que nous avons acquis notre formation de pathologiste, grâce à l'enseignement *bonévole* de M. G. ARNAUD, directeur honoraire, dont la compétence en mycologie est universellement reconnue, grâce aussi aux conseils amicaux de M<sup>lle</sup> GAUDINEAU et de M. BARTHELET.

Notre sincère et affectueuse gratitude va aussi à tous nos camarades de laboratoire qui ont fait que ces années de guerre, où la recherche était difficile, nous laissent un souvenir si sympathique et tout particulièrement G. CAMUS dont nous avons toujours vivement apprécié les suggestions et qui a bien voulu revoir le texte de notre manuscrit et R. LONGCHAMP dont l'appui matériel nous a été d'un très grand secours.

Nous tenons enfin à remercier tout spécialement M. J. VINCENT au talent duquel sont dues les belles photographies qui illustrent ce travail.

\*  
\* \*

A notre connaissance, les seules recherches ayant eu pour but de réaliser des cultures associées de parasites obligatoires et de tissus végétaux sont celles de WHITE et de SEGRETAIN que nous avons mentionnées dans l'introduction de notre mémoire, aussi nous n'examinerons pas l'histoire de cette question, mais nous nous bornerons à résumer dans cette partie les principaux travaux réalisés sur la culture des tissus elle-même. Nous décrirons ensuite le matériel que nous avons étudié.

Le troisième chapitre sera consacré à la culture des tissus. Il comprendra la description des techniques que nous avons utilisées, puis des caractères morphologiques anatomiques et des différentes espèces que nous avons cultivées : lianes, plantes ligneuses et plantes herbacées. Nous examinerons ensuite certaines particularités physiologiques de ces tissus.

La réalisation de cultures de quelques agents pathogènes en présence de tissus cultivés *in vitro* sont examinés dans le quatrième chapitre où nous parlerons tout d'abord de la culture du Mildiou, puis de l'Oidium de la vigne. Nous décrirons ensuite nos tentatives de culture des Urédinales et de divers virus. Le cinquième chapitre enfin résumera les considérations générales sur ces recherches et nos conclusions.

## CHAPITRE I.

## HISTORIQUE.

L'histoire de la culture des tissus végétaux a déjà été exposée maintes fois. A trois reprises, WHITE a résumé les résultats acquis par les différents chercheurs qui ont étudié ce problème (73, 76, 78). FIEDLER a publié, en 1938, un article traitant également ce sujet (14) et GAUTHERET (16, 17, 20) dans plusieurs mémoires, a été amené à exposer de la même manière les étapes successives qui ont abouti à la réalisation de la culture des tissus végétaux. Mais, depuis quelques années, les progrès réalisés dans ce domaine ont été très rapides, si bien qu'il nous a paru utile de faire une nouvelle mise au point historique en insistant seulement sur les travaux récents. Nous ne nous proposons pas d'énumérer les nombreux mémoires consacrés à la culture des tissus végétaux, mais plutôt d'indiquer les principales tentatives dont elle a fait l'objet en nous étendant plus spécialement sur l'état qu'elle avait atteint au moment où nous avons commencé nos recherches.

C'est HABERLANDT (30) qui, dès 1898, eut l'intuition du grand intérêt que pourrait présenter l'étude du développement de tissus végétaux hors de l'organisme. Dès cette époque, il essaya de réaliser des cultures de tissus. Pour cela, il isola de très petits fragments de tissus provenant par exemple de parenchyme palissadique de *Lamium purpureum*, de moelle d'*Eichhornia crassipes*, d'épidermes de *Fuschia*, d'*Ornithogalum*, etc., et il les transporta dans des milieux nutritifs variés où ils survécurent un certain temps, mais sans jamais se multiplier. HABERLANDT ne pouvant comprendre les raisons de ces échecs, se découragea, et ce problème fut abandonné pendant de longues années. C'est seulement en 1917 que de nouveaux efforts furent tentés pour le résoudre. BOBILIOFF-PREISSER (6) essaya de cultiver des cellules isolées obtenues en dilacérant des fragments de tissus dans une solution nutritive. Il observa ainsi une survie considérable de certaines cellules, mais ne parvint pas à provoquer leur multiplication. L'année suivante, LAMPRECHT (39) s'inspirant des premiers travaux d'HABERLANDT, essaya de cultiver des fragments de feuilles de Crassulacées. Mais, au lieu de les transporter dans des milieux artificiels, il les transplantait à la surface de blessures provoquées sur des feuilles adhérant encore à la plante, de manière que les cellules vivantes puissent ainsi servir de substratum. LAMPRECHT ne parvint pas mieux que ses prédécesseurs à faire proliférer ses explantats. En 1919, KNUDSON (34) tenta sans plus de succès de cultiver les cellules qui se séparent spontanément de la coiffe des racines; en 1921, HABERLANDT (31) fit une nouvelle tentative en utilisant des fragments de tissus beaucoup plus volumineux qu'au cours de ses premiers essais, mais sans obtenir de meilleurs résultats que dans ses premières expériences.

C'est alors que KOTTE (35) et ROBBINS (63) orientèrent le problème de la culture *in vitro* dans une voie nouvelle. Ils tentèrent de cultiver des méristèmes radiculaires et leurs recherches furent rapidement couronnées de succès. Ils obtinrent pour la première fois la multiplication des cellules de ces méristèmes, et mirent au point une technique qui devait permettre à WHITE (74) de réaliser en 1934 la culture indéfinie des racines de

Tomate et de quelques autres Dicotylédones. Ces méristèmes radiculaires cultivés *in vitro* se transformaient toujours en racines. Ils étaient donc le point de départ de cultures d'organes ayant une structure bien définie et non de véritables cultures de tissus. Malgré ces brillants résultats, le problème demeurait donc entier. Aussi, tandis que beaucoup de chercheurs suivaient la voie inaugurée par ROBBINS, d'autres, tels que BÜRGER (7) [1926], CZECH (13) [1926], ULEHLA (72) [1928], SCHMUCKER (65) [1929], PREIFFER (61) [1931], etc., continuaient à subir l'influence d'HABERLANDT, et s'efforçaient de réaliser de véritables cultures de tissus en isolant des fragments de parenchymes, et en les plaçant dans des milieux variés. Comme les précédentes, leurs tentatives furent entièrement négatives. La plupart des botanistes se rallièrent alors aux idées de KÜSTER (38), qui déclarait le problème insoluble, et, en 1931, CRACIUN (12) résumait l'opinion générale en écrivant : « Tous les auteurs paraissent d'accord sur le fait qu'il est impossible d'obtenir de véritables cultures de tissus ».

Cependant, ces conclusions pessimistes ne parvenaient pas à convaincre tous les chercheurs, et GAUTHERET fut le premier à comprendre la raison de ces échecs répétés. La plupart des tentatives réalisées jusque là avaient en effet porté sur des tissus très différenciés, par exemple des parenchymes ou des épidermes composés de cellules incapables de se diviser, même s'ils demeurent sur la plante entière, tandis que d'autres mettaient en culture des méristèmes primaires qui sont incapables de proliférer d'une manière désordonnée, et reforment constamment des organes suivant un processus immuable. C'est pourquoi il abandonna la culture de ces points végétatifs, et s'adressa aux méristèmes secondaires des Dicotylédones, dont les cellules sont capables d'une prolifération désordonnée qui se manifeste lorsqu'on blesse les tiges, par la formation de cals souvent volumineux. En plaçant des fragments de tissus cambial de différents arbres, Érable, Saule, Orme, Peuplier, etc., sur des tampons de coton imprégnés de la solution de KNOP glucosée, ou en les piquant dans un milieu gélosé ayant la même constitution générale GAUTHERET (15) [1934] obtint une prolifération intense; les fragments isolés produisaient en quelques semaines des masses volumineuses de tissus parenchymateux et il réalisa pour la première fois de véritables cultures de tissus végétaux.

GAUTHERET chercha à prolonger la survie de ses cultures par des repiquages, mais il ne put les maintenir plus de dix-huit mois. Les milieux qu'il utilisait alors étaient impropres à assurer la survie indéfinie de cette catégorie de tissus. Il fallut encore plus de quatre ans de recherches pour obtenir ce résultat, qui fut annoncé presque simultanément par WHITE (77) en décembre 1938, par GAUTHERET (18) en janvier 1939 et par NOBÉCOURT (59) en février 1939. Pour y parvenir, WHITE s'était adressé à un type de tissu très particulier. Il mettait en culture des tumeurs qui se forment spontanément sur les tiges d'un hybride de Tabac obtenu par KOSTOFF (*Nicotiana langsdorffii*  $\times$  *N. glauca*). Le milieu de culture qu'il utilisait était une solution minérale rendue à demi solide par de la gélose, et contenant en outre, du saccharose et de l'extrait de levure. GAUTHERET et NOBÉCOURT parvinrent à cultiver non pas un tissu pathologique, mais le tissu normal de la racine de carotte sur un milieu entièrement synthétique renfermant des sels minéraux, du glucose et des substances de croissance. Ces substances de croissance bien définies étaient l'Aneurine, la Cystéine et l'acide Indole  $\beta$  acétique.

GAUTHERET (19) étendit alors ces premiers résultats à des organes charnus appartenant à d'autres végétaux tels que le rhizome de Topinambour, la racine d'Endive, de Scorsonère et de Chou-navet, et, en 1941, il parvint à en isoler des souches de tissus qui prolifèrent encore. WHITE (80, 81) de son côté, étudia d'autres tissus de tumeurs, et

il put cultiver les tissus de galles provoquées par le *Phytomonas tumefaciens* sur des tiges de Soleil et de Pervenche de Madagascar.

Ainsi, en 1943, au moment où nous avons commencé nos recherches, on était parvenu à cultiver des tissus de diverses tumeurs, et ceux de quelques plantes produisant des organes charnus. On ignorait encore si les tissus normaux de la plupart des végétaux étaient susceptibles de proliférer *in vitro*. C'est ainsi que les tissus d'espèces ligneuses comme les arbres n'avaient fait l'objet que de travaux incomplets. Les tissus des lianes dont l'élongation si rapide des tiges témoigne d'une activité intense n'avaient pas été étudiés, de même que ceux des espèces herbacées qui produisent des tiges annuelles. Enfin, tous ces essais n'avaient porté que sur des Dicotylédones.

Pour effectuer la culture des parasites obligatoires que nous nous proposons d'entreprendre, il nous a fallu tout d'abord réaliser des cultures de tissus de ces différentes catégories de végétaux, arbres, lianes et plantes herbacées.

## CHAPITRE II.

## MATÉRIEL.

Ainsi que nous venons de l'indiquer au cours du chapitre précédent, nos recherches sur la culture de divers parasites obligatoires nous ont amené à essayer d'obtenir le développement *in vitro* des tissus d'un grand nombre d'espèces de Dicotylédones. Avant d'exposer les résultats de nos recherches, il nous paraît utile de décrire le matériel que nous avons choisi, en indiquant les considérations qui ont guidé notre choix.

Nos premiers travaux ont porté sur la culture du Mildiou de la Vigne : *Plasmopara viticola* (BERK. et CURT.) BERL. et DE TONI, champignon de la famille des Péronosporacées qui attaque la Vigne et un certain nombre de plantes voisines. Pour tenter d'obtenir son développement, nous avons dû réaliser au préalable des cultures de tissus d'espèces de Vigne facilement attaquées par ce champignon, et pour cela, nous avons tout d'abord étudié trois cépages de notre Vigne indigène *Vitis vinifera* L. (49). Ce sont les variétés « Aramon » et « Carignan », cultivées surtout dans le Languedoc pour la production du vin et « Chasselas de Fontainebleau », qui fournit du raisin de table. Désirant étudier ensuite la résistance au Mildiou des différentes espèces de *Vitis*, nous avons tenté d'obtenir des cultures de Vignes exotiques présentant tous les degrés de résistance au parasite, depuis une extrême sensibilité jusqu'à l'immunité complète. Ce sont tout d'abord les espèces américaines : *V. vulpina* L., *V. rupestris* SCHEELE, *V. riparia* MICHX., *V. arizonica* ENGEL. et la variété « Noah » que l'on suppose être hybride entre *V. riparia* et *V. labrusca*, puis deux espèces asiatiques *V. Coignetiae* PLANCH. et *V. Davidii* (RAMON) FOËX.

Les souches de tissu de *Vitis vinifera* L., que nous avons isolées au cours de nos premières recherches, nous ont ensuite servi à cultiver *in vitro* l'Oïdium de la Vigne : *Uncinula necator* (SCHW.) BURR., Ascomycète de la famille des Érysiphacées.

La facilité avec laquelle ces tissus se cultivent *in vitro* nous ont incité à étudier d'autres plantes de la même famille, tout d'abord deux *Parthenocissus* : *P. tricuspidata* (SIEB. et ZUCC.) PLANCH. et *P. quinquefolia* PLANCH. que l'on cultive dans un but ornemental sous le nom de Vigne-vierge, puis deux *Cissus* : *Cissus incisa* (TOR. et GR.) DESMOUL. et *Cissus discolor* WENT.

Toutes les espèces que nous venons de citer sont des lianes, c'est-à-dire des végétaux dont la tige s'accroît en longueur avec une très grande rapidité, tout en demeurant relativement mince, et est incapable de s'élever verticalement sans le secours de supports. Nous pensions alors qu'il pourrait y avoir une relation entre cette rapide élongation des tiges et la facilité avec laquelle leurs tissus prolifèrent *in vitro*; aussi, désirant étendre nos cultures de parasites obligatoires, nous avons tout naturellement cherché des espèces qui attaquent d'autres lianes.

Parmi ceux-ci, les Urédinales forment un groupe très homogène d'espèces étroitement spécialisées et strictement parasites, se développant sur les végétaux les plus variés, aussi nous n'avons pas eu de peine à trouver des lianes parasitées par ces champignons.

La famille des Rosacées renferme un certain nombre de plantes sarmenteuses réparties dans les genres *Rubus* et *Rosa*, qui répondent à ces conditions. Sur les tiges de *Rubus*

*fruticosus* L. apparaissent au printemps les pustules d'Urédospores de *Kuehneola albida* (KÜHN) MAGN.; au cours de l'été, ses feuilles sont envahies par le *Phragmidium violaceum* SCHUTZ. et le *Phragmidium rubi* (PERS.) WINT.; de même, sur les tiges et feuilles de divers rosiers se développent plusieurs autres *Phragmidium*. La grande vigueur de ces plantes et le fait que les parasites apparaissent sur des tissus qui, comme ceux de la tige, sont moins différenciés que ceux des feuilles, nous paraissent réaliser des conditions favorables pour que nous tentions la culture associée de ces Urédinées sur des tissus vivants maintenus *in vitro*. Ceci nous a amené à réaliser des cultures de tissus de trois espèces de *Rubus* : *R. fruticosus* L., la Ronce indigène, *R. reflexus* KER. plante du sud de la Chine et *R. kinashi* LEV. originaire du Japon, et d'un rosier *Rosa wichuraiana* CRÉPIN var. «American pillar», que nous avons choisi à cause de sa grande vigueur.

La facilité avec laquelle nous avons obtenu des cultures de tissus de Ronce nous a incité à étudier d'autres Rosacées ligneuses, mais non sarmenteuses, également attaquées par des Urédinées; nous avons choisi l'Aubépine : *Crataegus monogyna* JACQ. et le Poirier : *Pyrus communis* L. var. «Conférence», dont les tiges sont souvent attaquées et déformées par des *Gymnosporangium*. Le *Gymnosporangium clavariaeforme* (JACQ.) REESS. forme des écidies, non seulement sur les feuilles, mais encore sur d'autres organes comme la tige ou l'ovaire de l'aubépine. *G. Sabinæ* (DIKS.) WINT. attaque le Poirier de la même manière.

Cherchant ensuite d'autres Urédinées faciles à inoculer, qui se développent également sur des tissus peu différenciés nous avons choisi la rouille du Muflier : *Puccinia Antirrhini* DIET. et HOLWAY, qui attaque avec une grande violence presque tous les organes de cette plante, puis *Puccinia Malvacearum* MONT. que l'on rencontre fréquemment au printemps sur les feuilles et les tiges de diverses Malvacées. Ceci nous a amené à essayer de réaliser des cultures de tissus de Muflier *Antirrhinum majus* L. et de diverses Malvacées, notamment de la grande Mauve (*Malva sylvestris* L.), de Guimauve (*Althea officinalis* L.), de Guimauve de Thuringe (*Althea thuringiaca* L.) et d'Abutilon d'Avicenne (*Abutilon avicennae* GAERTN.). Nous avons enfin voulu étendre cette méthode de cultures associée aux virus, et notre choix a porté sur les mieux connus, c'est-à-dire le virus de la Mosaïque du Tabac, puis le Virus X et le virus Y qui causent des maladies de dégénérescence de la Pomme de terre. Toutes les tentatives de culture de tissu de Pomme de terre effectuées jusqu'ici ont constamment échoué. Fort heureusement, il est possible de maintenir ces virus en les inoculant au Tabac et c'est en les associant aux tissus de cette plante que nous avons pu les cultiver; pour cela, nous avons tout d'abord réalisé des cultures de tissus de Tabac, *Nicotiana Tabacum* L. et nous avons choisi la variété «White Burley», qui est souvent utilisée pour l'étude de ces virus.

Nous avons groupé toutes les espèces sur lesquelles nous avons travaillé dans le Tableau suivant, en mentionnant, pour chaque espèce, les organes utilisés pour nos cultures et les parasites étudiés :

| NOMS LATINS.                                        | NOMS FRANÇAIS.                          | FAMILLE.    | ORGANE EXPÉRIMENTÉ. | PARASITE ÉTUDIÉ.                                                                                       |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Vitis vinifera</i> L.....                        | Vigne européenne.<br>Diverses variétés. | Ampélidées. | Tige.               | <i>Plasmopara viticola</i> (BERK. et CURT.) BERL. et DE TONI.<br><i>Uncinula necator</i> (SCHW.) BURR. |
| <i>Vitis vulpina</i> L. = <i>V. cordifolia</i> LAM. | Vigne américaine.                       | Id.         | Id.                 | <i>Plasmopara viticola</i> (BERK. et CURT.) BERL. et DE TONI.                                          |
| <i>Vitis rupestris</i> SCHREB....                   | Id.                                     | Id.         | Id.                 | Id.                                                                                                    |

| NOMS LATINS.                                                          | NOMS FRANÇAIS.                                 | FAMILLE.         | ORGANE EXPÉRIMENTÉ.    | PARASITE ÉTUDIÉ.                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Vitis riparia</i> MICX. . . .                                      | Vigne américaine.                              | Ampélidées.      | Tige.                  | <i>Plasmopara viticola</i> (BERK et CURT.) BERL. ET DE TONI.                                                         |
| <i>Vitis arizonica</i> ENGEL. . . .                                   | Id.                                            | Id.              | Id.                    | Id.                                                                                                                  |
| <i>Vitis riparia</i> MICX. × <i>Vitis labrusca</i> L. variété «Noah». | Id.                                            | Id.              | Id.                    | Id.                                                                                                                  |
| <i>Vitis Coignetiae</i> PLANCH. . .                                   | Vigne asiatique.                               | Id.              | Tige et vrille.        | Id.                                                                                                                  |
| <i>Vitis Davidii</i> (RAMON) FÖRER                                    | Id.                                            | Id.              | Tige.                  | Id.                                                                                                                  |
| <i>Parthenocissus quinquefolia</i> (L.) PLANCH.                       | Vigne-vierge.                                  | Id.              | Tige et pétioles.      | Id.                                                                                                                  |
| <i>Parthenocissus tricuspidata</i> (SIEB et ZUCC) PLANCH.             | Id.                                            | Id.              | Id.                    | Id.                                                                                                                  |
| <i>Cissus incisa</i> (TORR et GR.) DESMOUL.                           | Id.                                            | Id.              | Tige.                  | Id.                                                                                                                  |
| <i>Cissus discolor</i> WENT. . . .                                    | Id.                                            | Id.              | Id.                    | Id.                                                                                                                  |
| <i>Rubus fruticosus</i> L. . . . .                                    | Ronce.                                         | Rosacées.        | Id.                    | <i>Kuchnola albida</i> (KÜHN) MAGN.<br><i>Phragmidium violaceum</i> SCHUTZ.<br><i>Phragmidium rubi</i> (PERS.) WINT. |
| <i>Rubus reflexus</i> KER. . . . .                                    | Id.                                            | Id.              | Id.                    | Id.                                                                                                                  |
| <i>Rubus kinashii</i> LÉVEL. . . .                                    | Id.                                            | Id.              | Id.                    | Id.                                                                                                                  |
| <i>Rosa wichuraiana</i> CREPIN. . .                                   | Rosier grimpant var. «American pillar».        | Id.              | Id.                    | Divers <i>Phragmidium</i> .                                                                                          |
| <i>Crataegus monogyna</i> JACQ.                                       | Aubépine.                                      | Id.              | Id.                    | <i>Gymnosporangium clavariaeforme</i> (JACQ.) REES.                                                                  |
| <i>Pyrus communis</i> L. . . . .                                      | Poirier var. «Conférence».                     | Id.              | Tige et tissu cambial. | <i>Gymnosporangium sabiniae</i> (DICKS.) WINT.                                                                       |
| <i>Syringa vulgaris</i> L. . . . .                                    | Lilas var. «M <sup>me</sup> Florent Stepmann». | Oléacées.        | Tige.                  |                                                                                                                      |
| <i>Antirrhinum majus</i> L. . . .                                     | Muflier.                                       | Scrofulariacées. | Id.                    | <i>Puccinia Antirrhini</i> DIET. et HOLWAY.                                                                          |
| <i>Malva sylvestris</i> L. . . . .                                    | Mauve.                                         | Malvacées.       | Id.                    | <i>Puccinia malvacearum</i> MONT.                                                                                    |
| <i>Althea officinalis</i> L. . . . .                                  | Guimauve.                                      | Id.              | Id.                    | Id.                                                                                                                  |
| <i>Althea thuringiaca</i> L. . . .                                    | Id.                                            | Id.              | Id.                    | Id.                                                                                                                  |
| <i>Abutilon avicennae</i> GAERTN.                                     | Id.                                            | Id.              | Tige et tumeurs.       | Id.                                                                                                                  |
| <i>Nicotiana tabacum</i> L. . . .                                     | Tabac var. «White hurley».                     | Solanées.        | Id.                    | Virus de la Mosaïque du Tabac.<br>Virus de la Mosaïque du Concombre.<br>Virus X, Virus Y de la Pomme de terre.       |

## CHAPITRE III.

## CULTURE DES TISSUS.

## A. TECHNIQUES GÉNÉRALES.

La réalisation de cultures de tissus végétaux est, en grande partie, conditionnée par la création d'un milieu nutritif convenable et de conditions adaptées à la nutrition des cellules que l'on veut cultiver. Les techniques que nous avons utilisées sont inspirées de celles qui, imaginées par GAUTHERET (20), lui ont permis d'obtenir pour la première fois la survie indéfinie des tissus de Carotte. Elles en diffèrent cependant par quelques détails, car le matériel que nous avons employé nous a obligé à modifier les procédés cultureux imaginés par cet auteur, en les adaptant aux problèmes que nous devons résoudre. Nous indiquerons tout d'abord les milieux de culture que nous avons utilisés, puis les diverses méthodes employées pour prélever aseptiquement les tissus et pour effectuer le repiquage des cultures. Nous examinerons enfin les procédés dont nous nous sommes servis pour étudier la structure de ces tissus.

## 1. MILIEUX DE CULTURE.

Les milieux de culture employés sont relativement simples; ils renferment, dissous dans l'eau des sels minéraux, un aliment glucidique, diverses substances de croissance, et sont solidifiés par de la gélose.

L'eau utilisée dans la préparation des milieux doit être très pure, et dépourvue de tout élément organique ou minéral. L'eau distillée généralement employée dans les laboratoires est obtenue en faisant usage d'alambics métalliques et ne peut convenir pour cet usage, car elle renferme des traces de métaux lourds très toxiques et notamment de cuivre. Il convient donc de la distiller et de la conserver dans des appareils en Pyrex.

Les sels minéraux renfermant les aliments plastiques nécessaires à la croissance de toute plante supérieure, sont fournis par la solution de KNO<sup>3</sup> <sup>(1)</sup> qui est utilisée après dilution de moitié. Elle est additionnée au moment de l'emploi de très faibles

<sup>(1)</sup> Solution de KNO<sup>3</sup> diluée de moitié :

|                                                                               |                       |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Eau distillée dans le Pyrex.....                                              | 1.000 cm <sup>3</sup> |
| Nitrate de Calcium (NO <sup>3</sup> ) <sup>2</sup> Ca, 4H <sup>2</sup> O..... | 0,50 gr.              |
| Nitrate de Potassium NO <sup>3</sup> K.....                                   | 0,125 gr.             |
| Sulfate de Magnésium SO <sup>4</sup> Mg, 7H <sup>2</sup> O.....               | 0,125 gr.             |
| Phosphate monopotassique PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> K.....                | 0,125 gr.             |

Dissoudre les quatre premiers sels sans précautions particulières; ajouter ensuite le phosphate monopotassique broyé, et agiter constamment jusqu'à dissolution complète, de façon à éviter la précipitation du calcium et du magnésium sous forme de phosphates, par suite d'une concentration locale de la solution.

quantités d'éléments oligodynamiques qui sont contenus dans la solution de BERTHELOT<sup>(1)</sup> légèrement modifiée par suppression du calcium que l'on apporte déjà avec le liquide de Knor et par addition d'Iode qui favorise la multiplication cellulaire. Nous ajoutons une goutte de cette solution pour 100 centimètres cubes de milieu.

Comme aliment glucidique nous avons uniquement utilisé le glucose pur à des concentrations variant de 3 à 5 p. 100.

Les substances de croissance sont incorporées sous forme de solution aqueuse au moment de la préparation des milieux de culture. Nous utilisons le chlorhydrate de cystéine à la concentration de  $10^{-5}$  et l'aneurine à la concentration de  $10^{-6}$ . L'acide pantothénique est ajouté à l'état de pantothénate de calcium, l'inositol et la biotine sous forme de solutions du produit pur. Nous n'avons d'ailleurs utilisé ces trois dernières substances qu'exceptionnellement, seulement dans le cas de tissus d'arbres et de plantes de la famille des Malvacées. Comme hétéroauxine, nous utilisons le plus souvent l'acide naphthyle acétique, qui présente l'avantage d'être plus stable à la lumière que l'acide indole- $\beta$ -acétique. Ces substances sont également incorporées sous forme de solution aqueuse et utilisées à des concentrations variant de  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$ .

Les tissus isolés ne supportent pas l'immersion à l'intérieur des milieux liquides, c'est pourquoi ceux-ci sont toujours solidifiés par de la gélose utilisée à la concentration de 1,2 p. 100. La gélose est physiologiquement inactive; son rôle est donc purement mécanique.

Pour préparer les milieux de culture on commence par diluer de moitié la solution de Knor, on lui ajoute les oligo-éléments, le glucose, les substances de croissance, puis la gélose, et on porte lentement à l'ébullition pour obtenir la dissolution complète de ce dernier produit. La solution nutritive est ensuite filtrée, puis répartie dans des tubes de culture de 16 centimètres de long sur 24 ou 30 millimètres de diamètre, et enfin stérilisée à l'autoclave à  $110^{\circ}$  pendant 20 minutes. A condition que les milieux ne soient pas alcalins, ce qui est habituellement le cas, toutes ces substances peuvent supporter  $110^{\circ}$ ; toutefois, il ne faut pas dépasser cette température, car alors la vitamine B<sub>1</sub> s'hydrolyse assez rapidement; les autres facteurs de croissance, hétéroauxine, cystéine, inositol, acide pantothénique et biotine, sont, au contraire, thermostables.

## 2. PRÉLÈVEMENT ASEPTIQUE DES TISSUS.

Le prélèvement aseptique des tissus constitue l'opération la plus délicate de toute la technique; le soin que l'on apporte à la réaliser conditionne, en grande partie, la réussite de la culture. Il n'existe pas de méthode vraiment générale, mais plusieurs procédés adaptés chacun à un matériel donné. Nous décrirons successivement les méthodes que nous avons employées pour les tiges minces de plantes herbacées ou

<sup>(1)</sup> Solution de BERTHELOT modifiée :

|                                                                                           |                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Eau.....                                                                                  | 1.000 cm <sup>3</sup> |
| Sulfate ferrique (SO <sup>4</sup> ) <sup>2</sup> Fe <sup>3</sup> , 9H <sup>2</sup> O..... | 50 gr.                |
| Sulfate de Manganèse SO <sup>4</sup> Mn, 7H <sup>2</sup> O.....                           | 2 gr.                 |
| Iodure de Potassium IK.....                                                               | 0,5 gr.               |
| Chlorure de Nickel Cl <sup>2</sup> Ni, 6H <sup>2</sup> O.....                             | 0,05 gr.              |
| Chlorure de Cobalt Cl <sup>2</sup> Co, 6H <sup>2</sup> O.....                             | 0,05 gr.              |
| Sulfate de Titane 5TiO <sup>3</sup> , SO <sup>3</sup> , 5H <sup>2</sup> O.....            | 0,20 gr.              |
| Sulfate de Zinc SO <sup>4</sup> Zn, 7H <sup>2</sup> O.....                                | 0,10 gr.              |
| Sulfate de Cuivre SO <sup>4</sup> Cu, 5H <sup>2</sup> O.....                              | 0,05 gr.              |
| Sulfate de Glucinium SO <sup>4</sup> Be, 4H <sup>2</sup> O.....                           | 0,10 gr.              |
| Acide Borique BO <sup>2</sup> H <sup>3</sup> .....                                        | 0,05 gr.              |
| Acide sulfurique à 66° Bé.....                                                            | 1 cm <sup>3</sup>     |

ligneuses, pour le tissu cambial des arbres, pour les racines minces et enfin pour les tissus de Crown-Gall.

a. *Tiges aériennes de faible diamètre.* — L'isolement aseptique de fragments de tiges aériennes est facilement réalisable : en effet, la surface de ces organes est peu riche en microorganismes, si bien que l'on peut éviter les stérilisations profondes utilisées pour les organes souterrains par GAUTHERET, et qui sont inapplicables dans le cas présent, en raison de la position superficielle de la zone génératrice. Nous opérons donc de la manière suivante : les tiges soigneusement débarrassées de leurs feuilles, vrilles, stipules etc. . . sont découpées en fragments de 30 centimètres de long, que l'on plonge rapidement dans de l'alcool à 96°. Ce trempage permet d'éliminer l'enduit cireux qui recouvre fréquemment les organes aériens et assure donc un mouillage complet de leur surface sans interposition de bulles d'air. Les fragments sont retirés de l'alcool après quelques secondes et plongés sans lavage préalable dans une solution d'hypochlorite de calcium à 70 grammes par litre <sup>(1)</sup>. Les organes restent pendant une demi-heure au contact de cette solution. La cuticule qui recouvre la tige est suffisamment imperméable pour que les tissus internes ne soient pas tués par ce traitement, alors que s'ils avaient été épluchés, ils auraient été en grande partie détruits par l'hypochlorite ; après une demi-heure, les tiges sont retirées de la solution, essuyées avec du papier filtre stérile, puis rincées à deux reprises avec de l'eau stérile.

Après ce lavage, on épluche les organes ; pour cela, on les retire de l'éprouvette dans laquelle ils baignent dans l'eau, on les trempe dans l'alcool et on les place rapidement entre deux feuilles de papier stérile. On élimine ensuite l'épiderme en raclant très légèrement avec un scalpel tranchant. On effectue cette opération en maintenant la tige sous une feuille de papier stérile. L'organe ainsi épluché est de nouveau trempé pendant quelques instants dans de l'alcool à 95° pour en parfaire l'aseptie ; puis, après rinçage à l'eau stérile, on le découpe en petits tronçons de 1,5 à 2 centimètres de long. Les fragments ainsi obtenus ne sont pas symétriques. Ils possèdent deux extrémités qui n'ont pas les mêmes propriétés. En général, seule l'extrémité radicale de l'explantat, c'est-à-dire celle qui est normalement tournée vers la racine est capable de se développer. Or, comme le contact du milieu inhibe souvent la croissance, cette partie doit se trouver à l'air libre. Il convient donc au cours des opérations de stérilisation de repérer soigneusement l'orientation des tiges de façon à pouvoir après découpage, planter verticalement le fragment dans la gélose dans une position inverse de celle qu'il occupe dans la plante, de façon que son extrémité radicale tournée vers le haut ne soit pas en contact avec le substratum.

Les tubes de culture bouchés avec un tampon de coton sont ensuite obturés presque hermétiquement, au moyen de petits carrés de papier d'étain de 7 centimètres de côté stérilisés à l'autoclave. Ce capuchonnage a pour but de maintenir l'atmosphère du tube saturée de vapeur d'eau et d'éviter la concentration du milieu par évaporation. Cette méthode permet dans les cas les plus favorables d'obtenir jusqu'à 90 p. 100 de cultures aseptiques.

b. *Tissu cambial d'arbres.* — Au cours de ses premières recherches sur la culture du tissu cambial d'arbres, GAUTHERET effectuait ses prélèvements directement sur le terrain. Cette technique présente certains inconvénients matériels dont le principal est de néces-

<sup>(1)</sup> Pour préparer cette solution, on ajoute 70 grammes d'hypochlorite de calcium titrant 200° chlorométriques dans 1 litre d'eau, on agite continuellement pendant 10 minutes, et l'on filtre enfin sur papier très épais.

siter le transport en pleine forêt, souvent à une grande distance des objets aseptiques nécessaires à la réalisation des cultures. De plus, lorsque l'on travaille en plein air, les contaminations accidentelles par les germes de microorganismes qui flottent dans l'air sont beaucoup plus fréquentes que dans une salle spécialement aménagée; aussi, avons-nous adopté la méthode suivante, permettant d'opérer au laboratoire. On fait débiter un tronc d'arbre ou de grosses branches en bûches de 1 mètre de long, qui peuvent rester vivantes très longtemps, et même se développer pour produire des pousses feuillées; ces branches sont ensuite transportées au laboratoire, où a lieu le prélèvement. La bûche est entièrement lavée à l'alcool avant d'être introduite dans la pièce réservée au travail aseptique. Dans cette salle, l'opérateur, à l'aide d'un couteau à deux manches semblable à une plane de menuisier, enlève sur une large surface, à l'endroit où il désire effectuer les prélèvements, la partie subérifiée et brune de l'écorce. Après un nouveau lavage à l'alcool, il élimine la partie la plus superficielle du liber, puis découpe avec la pointe d'un scalpel le tissu cambial toujours adhérent au bois en fragments rectangulaires de 1 cm.  $\times$  2 cm.; au moyen de pinces fines, il saisit alors ces fragments par un angle et les sépare du bois auquel ils n'adhèrent que faiblement; pour terminer, ces fragments sont ensemencés comme précédemment en les plantant dans des milieux gélosés. Le tissu cambial des espèces que nous avons étudiées ne présente pas de polarité très nette, si bien que nous n'avons pas tenu compte de l'orientation des fragments au moment de leur mise en culture.

Cette méthode de prélèvement assure une moins bonne aseptie que la précédente et le nombre de cultures stériles ne dépasse jamais 60 à 70 p. 100.

c. *Racines de faible diamètre.* — Le prélèvement aseptique des tissus d'une racine est plus délicat à réaliser que celui d'un fragment de tige; les microorganismes qui pullulent dans le sol sont en effet beaucoup plus nombreux que ceux qui vivent à l'air libre; de plus, au cours de la croissance de la racine, il se forme constamment des radicelles dont la plupart meurent en peu de temps; ces radicelles se décomposent après leur mort et permettent aux microorganismes de s'introduire dans la profondeur des tissus. Pour réaliser des prélèvements sur ces organes, nous opérons de la façon suivante: on les épluche très légèrement afin d'éliminer les parties superficielles plus ou moins imperméables, et on les plonge pendant dix minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium à 70 grammes par litre. On leur fait subir alors un second épluchage également très superficiel, de manière à éliminer les tissus tués par l'hypochlorite, ainsi que la majeure partie des bactéries et des champignons. On les plonge ensuite une seconde fois dans l'hypochlorite pendant dix minutes également, afin de détruire les germes qui auraient pu échapper au premier traitement; un troisième épluchage enlève les cellules tuées par ce second trempage; on rince ensuite l'organe à l'eau stérile et on découpe les racines en tronçons de 1,5 à 2 centimètres qui sont finalement ensemencés comme des fragments de tige. L'expérience nous a montré que les résultats obtenus par deux traitements successifs à l'hypochlorite sont, en ce cas, bien supérieurs à ceux que l'on obtient en faisant agir le désinfectant en une seule fois. On peut réaliser ainsi l'asepsie d'organes très minces sans en éliminer une épaisseur de plus de 1 millimètre.

L'efficacité de cette méthode varie évidemment avec la nature des organes traités, elle est généralement moins sûre que les précédentes et permet rarement d'obtenir plus de 50 p. 100 de cultures aseptiques.

d. *Tissus de Crown-Gall.* — Les tissus de Crown-Gall renferment des cellules de *Phyto-*

*monas tumefaciens* qu'il convient d'éliminer au cours du prélèvement. Celles-ci sont heureusement peu nombreuses et ordinairement localisées à la périphérie de la tumeur ce qui rend possible le prélèvement aseptique des tissus internes. Il faut pour cela attendre que le Crown-Gall soit assez volumineux, mais en grossissant, la tumeur, au lieu de demeurer homogène, se fissure profondément et divers microorganismes peuvent alors pénétrer par ces fissures. En pratique, c'est environ deux mois après l'inoculation de la bactérie qu'il convient d'effectuer le prélèvement. Étant donné que ces tumeurs sont généralement peu volumineuses, on doit leur faire subir un traitement analogue à celui utilisé dans le cas des racines de faible diamètre, c'est-à-dire qu'après les avoir épluchées légèrement, on les trempe pendant dix minutes environ dans la solution d'hypochlorite à 70 grammes par litre, puis on les épluche une seconde fois, et l'on fait agir à nouveau le désinfectant pendant dix minutes avant de procéder à l'épluchage définitif. En ce cas, la proportion de cultures aseptiques varie beaucoup avec l'espèce. Les tumeurs de certaines plantes comme la Vigne paraissent ne renfermer que très peu de cellules bactériennes, d'autres au contraire, comme celles de *Datura*, en contiennent beaucoup. Si bien que dans certains cas (Vigne) presque toutes les cultures sont aseptiques, alors que dans d'autres au contraire (*Datura*) presque toutes sont contaminées par le *Phytomonas*.

### III. REPIQUAGES.

Les fragments d'organes mis en culture sont très hétérogènes, aussi leurs différents tissus se développent-ils très inégalement. Certains, par exemple le bois, ne prolifèrent pas, d'autres au contraire, comme le tissu cambial, s'accroissent d'une manière très active; cette croissance est fréquemment polarisée, et dans ce cas, seule l'extrémité radicale du fragment produit un cal important. D'autres fois, les proliférations ne sont abondantes qu'à l'intérieur du milieu comme si ce dernier activait le développement des tissus par son contact direct. Dans certains cas enfin, de nouveaux organes, tiges ou racines, apparaissent sur les néoformations. L'observation d'un fragment de tige ou de tissu cambial montre que la croissance s'installe plus ou moins vite. Au bout de quelques jours, le fragment se modifie. Il augmente de volume et produit des mamelons parenchymateux qui deviennent rapidement volumineux, continuent à s'accroître pendant quelques mois, puis cessent de se développer et les tissus meurent ensuite. Si l'on veut maintenir l'activité de la culture, il faut, avant que la croissance ne se relentisse, isoler un fragment de tissu dans la partie qui est en voie de prolifération intense, et le transporter sur un milieu neuf où il puisse continuer à se développer. Ceci constitue l'opération du repiquage.

Les cultures repiquées ne tardent pas à se modifier; chez certaines espèces, la prolifération est généralisée et tout l'explantat se transforme, augmente de volume, prend une forme globuleuse; chez d'autres, au contraire, la croissance est limitée à certaines régions privilégiées sur lesquelles apparaissent en des points limités de petits massifs de parenchyme, en voie de croissance active. Ces massifs se développent rapidement, certains se soudent entre eux et l'explantat primitif se recouvre ainsi, sur un ou plusieurs côtés, de tissus néoformés, alors que le reste se modifie à peine.

Parfois, les néoformations possèdent d'emblée un aspect différent des tissus normaux; dans d'autres cas les tissus se transforment très lentement, leur surface qui était lisse devient de plus en plus mamelonnée, ils élaborent moins de chlorophylle. Certaines espèces perdent à la longue la faculté d'émettre des racines. Après le premier repiquage, les tissus ne sont pas encore accoutumés à la vie *in vitro*, la croissance est souvent irrégu-

lière. Ils demeurent très fragiles. Certaines cultures se développent activement, d'autres, au contraire, très faiblement, et meurent au bout de quelques temps. Puis, peu à peu, les tissus se modifient sous l'effet de la culture; ils deviennent moins délicats et s'accoutument à la vie *in vitro*. Leur repiquage devient alors beaucoup plus aisé. Ceci explique que le repiquage primitif, qui a pour but d'isoler les tissus néoformés, encore très délicats, des tissus préexistants, soit très différent du repiquage d'une souche; il constitue en quelque sorte un prélèvement secondaire. Aussi, nous décrirons séparément le repiquage des cultures primitives et des souches anciennes.

a. *Repiquage de la culture primitive.* — Étant donnée la fragilité des tissus néoformés,

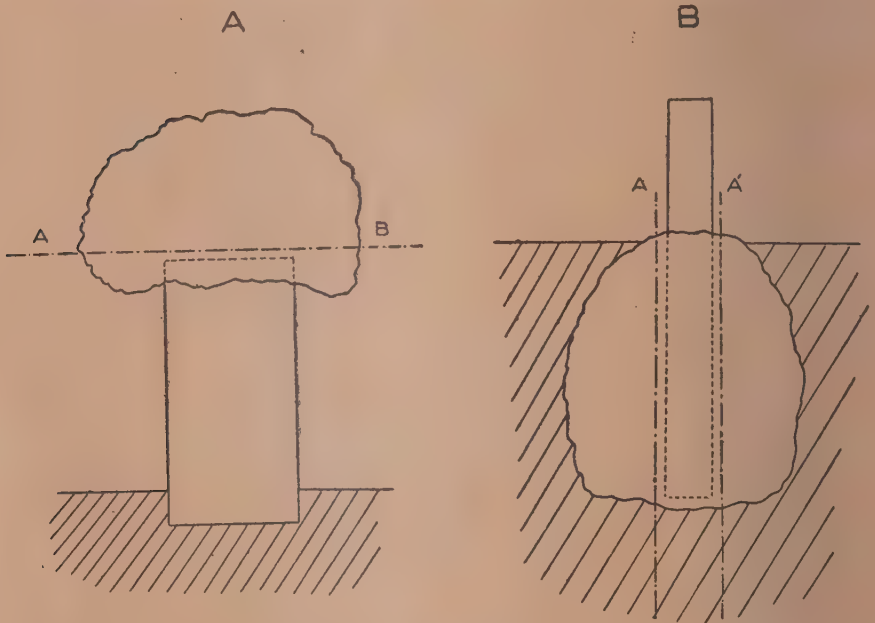


FIG. 1. — Repiquage des cals formés par des fragments de tige :

A. Cal formé à l'air libre; on le détache d'un trait de scalpel suivant la ligne AB.

B. Cal formé à l'intérieur du milieu; on le détache par deux traits de scalpel parallèles A et A'.

il faut apporter de grands soins à cette opération. On doit commencer par examiner soigneusement toutes les cultures, afin d'éliminer celles qui sont infectées, mal développées, ou en voie de nécrose. On enlève alors la capsule d'étain qui obture le tube de culture, on lave ce dernier à l'alcool, puis avec une pince on retire l'explantat du tube et on le transporte dans une boîte de Petri stérile où on peut l'examiner à loisir et le découper à l'abri des germes de microorganismes qui flottent dans l'air. Le découpage des tissus s'opère différemment selon que la prolifération a eu lieu à l'air libre ou à l'intérieur du milieu.

Dans le premier cas (fig. 1 A) nous repiquons ces cultures de la manière suivante : nous commençons par éliminer les organes tiges ou feuilles qui se sont éventuellement formés sur le cal, puis nous détachons ce dernier d'un trait de scalpel passant au niveau du raccord des tissus néoformés et des tissus préexistants. Si ce cal n'est pas trop

volumineux (moins de 0,5 cm. de diamètre) nous le transportons en entier sur un milieu neuf en appliquant la partie blessée par la lame du scalpel contre la surface de la gélose ; s'il est plus gros, nous le découpons en deux ou quatre fragments que nous repiquons séparément.

Dans le second cas, c'est-à-dire lorsque le cal se forme au contact du milieu de culture, nous opérons de la manière suivante : nous séparons des tissus préexistants la majeure partie des néoformations par deux traits de scalpel parallèles qui suivent les contours primitifs de la tige (fig. 1 B). Les deux fragments ainsi détachés sont ensuite transformés en cubes grossiers avant d'être placés dans un tube de milieu neuf. Nous avons remarqué qu'il y a intérêt au cours de cette première opération, à ne pas repiquer de fragments trop petits. Il faut en effet que les explantats ne mesurent pas moins de 5 millimètres de côté et que leur poids ne soit pas inférieur à 100 milligrammes. Dans les deux cas, les tubes ayant été ensemencés sont obturés d'une manière presque hermétique avec du papier d'étain stérile.

b. *Repiquage d'une souche.* — Les cultures provenant de souches anciennes forment généralement des masses homogènes qui s'accroissent d'une manière diffuse, leur repiquage est alors très simple : comme précédemment après avoir retiré la capsule d'étain qui obture le tube, on lave ce dernier à l'alcool, on extrait rapidement la colonie pour la placer dans une boîte de Pétri stérile, on la découpe alors en fragments réguliers de 0,5 cm. de côté que l'on porte rapidement sur un nouveau milieu, en prenant soin de les enfoncer très peu dans la gélose.

Il arrive parfois que le développement soit irrégulier et confiné en certaines régions de l'explantat, tandis que d'autres parties se nécrosent ou forment des amas de cellules géantes sans consistance. En outre, certains tissus produisent des organes tiges ou racines. Il faut au cours du repiquage éliminer ces organes, ainsi que les parties molles et nécrosées incapables de proliférer, pour ne garder que les tissus sains et fermes. Après cette opération, les tubes sont ensuite obturés de manière presque hermétique à l'aide d'une feuille de papier d'étain stérilisée.

#### IV. TECHNIQUES ANATOMIQUES.

Pour analyser la prolifération des cultures nous avons eu recours à des examens anatomiques. Nous croyons utile de décrire sommairement les techniques utilisées pour la réalisation des préparations destinées à ces examens. Cette réalisation comprenait les opérations suivantes : fixation des tissus, inclusion dans la paraffine, confection de coupes et enfin coloration.

a. *Fixation.* — Nous avons toujours utilisé comme fixateur le Picroformol de Bouin préparé au moment de l'emploi ; ce fixateur a la composition suivante :

|                                                |    |          |
|------------------------------------------------|----|----------|
| Solution aqueuse saturée d'acide picrique..... | 30 | volumes. |
| Formol à 40 p. 100.....                        | 10 | —        |
| Acide acétique cristallisable.....             | 2  | —        |

Ce fixateur est très pénétrant, et d'un usage commode pour les objets volumineux comme les cultures de tissus ; on peut les y laisser longtemps, sans qu'ils s'altèrent. En pratique, la durée de fixation que nous avons adoptée est de deux jours. Il n'est pas nécessaire de laver à l'eau après fixation. Il suffit de transporter les pièces dans l'alcool

à 90° qu'on change plusieurs fois. Nous avons fixé de cette façon soit des colonies entières, soit simplement les néoformations apparues sur les fragments. Après inclusion dans la paraffine, les objets étaient coupés en série au microtome Minot. Nos coupes avaient le plus souvent 12  $\mu$  d'épaisseur, les objets hétérogènes renfermant des parties dures et ayant tendance à se déchirer étaient coupés à 20  $\mu$ . Dans certains cas, cependant, notamment pour l'étude de la prolifération de tiges très lignifiées comme celles de Vigne ou d'Aubépine, nous avons dû renoncer à ce procédé, car toutes les coupes se déchiraient, ou la partie ligneuse s'émiettait; nous avons alors fait des coupes plus épaisses à main levée.

b. *Coloration.* — Les coupes collées et déparaffinées étaient ensuite traitées par la méthode de double coloration au bleu de méthylène et rouge de ruthénium. Pour cela, on colorait chaque préparation pendant cinq minutes par du bleu de méthylène aluné (bleu de méthylène 1, alun de potassium 10, eau 100); on lavait à l'eau et on colorait à nouveau pendant cinq minutes avec une solution de rouge de ruthénium, préparée au moment de l'emploi en ajoutant une trace de ce produit à quelques centimètres cubes d'eau ammoniacale, dans un verre de montre, de façon à obtenir une coloration rouge foncé. Les préparations étaient ensuite montées au baume de Canada.

Par cette méthode les cellules à parois cellulósiques se colorent en rouge, les vaisseaux et les éléments lignifiés en bleu violacé. D'autres constituants cellulaires sont également colorés comme les mucilages qui prennent une teinte rouge intense, et les tannins qui deviennent violet foncé.

## B. DÉVELOPPEMENT DE FRAGMENTS D'ORGANES ISOLÉS

Nous commencerons par considérer le développement de fragments d'organes isolés des différentes catégories de végétaux que nous avons étudiés : Lianes, Plantes ligneuses et Plantes herbacées.

### I. Développement de fragments de tiges de lianes.

Nos premières recherches ont porté sur la culture des tissus de Vigne; le développement remarquable de ces tissus *in vitro* nous a incité à étudier des espèces ayant une croissance analogue, c'est-à-dire d'autres Lianes. Les Lianes sont des végétaux dont les tiges s'accroissent en longueur avec une très grande rapidité tout en demeurant très minces. Ces tiges conservent pour cette raison une grande souplesse et ne peuvent s'élever verticalement sans le secours d'un support. La rapidité de leur croissance semble indiquer que leurs tissus sont capables de proliférer avec une activité particulièrement grande et nous avons pensé qu'il serait peut être relativement facile d'obtenir leur développement *in vitro*. C'est pourquoi nous avons tout d'abord étendu nos recherches à des plantes grimpantes susceptibles de servir d'hôte à des parasites obligatoires que nous nous proposons de cultiver.

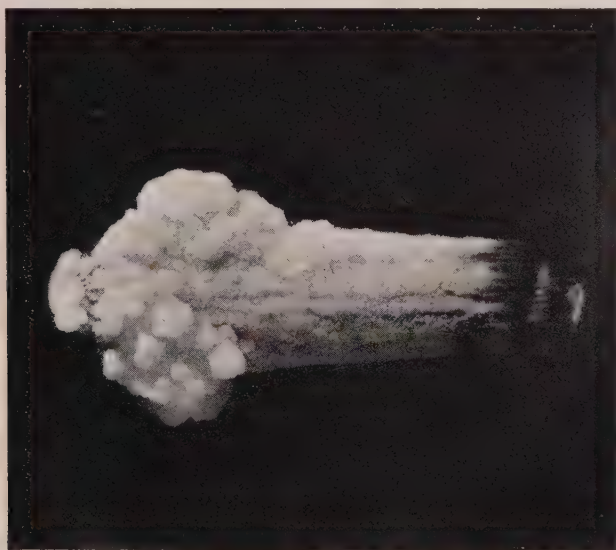
Nous étudierons tout d'abord diverses espèces de la famille des Ampélidées, Vigne, Vigne-vierge, *Cissus*, puis diverses Rosacées, Ronces et Rosiers, et nous mentionnerons enfin les quelques essais que nous avons tentés avec diverses plantes appartenant à d'autres familles. Pour chaque espèce, nous étudierons la morphologie externe, puis les caractères anatomiques des tissus cultivés.

Lorsqu'on fournit aux tissus simplement des sels minéraux et un sucre, les modifica-



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Fragments de tige de Vigne cultivés pendant deux mois sur un milieu dépourvu d'hétéro-auxine. Un cal volumineux s'est développé sur la face radicale située à l'air libre.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Fragment de liber de Vigne après deux mois de culture. Ce fragment était posé à plat sur le milieu. Remarquer que des proliférations abondantes sont apparues aux abords de l'extrémité radicale du fragment.



tions qu'apportent les substances nutritives surajoutées sont quantitatives et non qualitatives, ce que l'on peut exprimer en disant que la croissance demeure normale. Au contraire l'adjonction de certaines substances excitoformatrices comme les hétéroauxines, modifie profondément les caractères du développement des tissus et détermine une croissance anormale. Nous examinerons donc tout d'abord la croissance normale des tissus, puis leur développement en présence d'hétéroauxine.

#### a. AMPÉLIDÉES.

La famille des Ampélidées renferme un grand nombre de Lianes dont certaines croissent avec une grande vigueur. Leurs tiges, toujours très minces, rampent sur le sol ou s'élèvent sur des supports en s'accrochant à l'aide de vrilles ou de crampons. Nous commencerons par considérer les cultures de tissus que nous avons réalisées avec le genre *Vitis*. Nous examinerons ensuite les *Parthenocissus* et les *Cissus*.

I. GENRE *VITIS* : *Vitis vinifera* L. — Le genre *Vitis* qui n'est représenté en Europe que par une seule espèce : *Vitis vinifera* L. qui est largement répandue dans tout l'hémisphère Nord tandis qu'on rencontre en Amérique du Nord et en Asie un grand nombre d'autres espèces. Nous envisagerons tout d'abord la morphologie externe et la structure anatomique des cultures de *Vitis vinifera* L., puis de quelques espèces américaines et asiatiques.

A. *Morphologie externe.* — a. Croissance normale. — Nos essais ont porté surtout sur les tissus des cépages suivants : Aramon, Carignan et Chasselas de Fontainebleau. Pour étudier la croissance normale des tissus de cette espèce, nous utilisons des milieux gélosés ne renfermant pas de substances de croissance, mais simplement des sels minéraux et du glucose à la concentration de 3 ou 5 p. 100. Nous plantons verticalement les fragments de tige dans le substratum de façon à ce que la plus grande partie demeure à l'air libre, et nous les orientons en position inverse de celle qu'ils avaient sur la plante entière, c'est-à-dire de façon que leur face foliaire seule plonge dans la gélose. Placés dans ces conditions, des fragments de tige de Vigne commencent à proliférer au bout d'une huitaine de jours. Le début de la croissance est marqué par un léger gonflement de la tige et l'apparition d'un anneau continu de parenchyme néoformé sur l'emplacement de la section de la zone génératrice. Cet anneau s'épaissit et déborde de chaque côté sur les tissus différenciés, ses bords internes finissent par se souder pour former une calotte. La croissance se poursuit encore et les tissus deviennent légèrement chlorophylliens lorsqu'on les expose à la lumière. Au bout de deux mois, le cal ainsi formé atteint un diamètre de 10 à 12 millimètres (Pl. VI, fig. A). La croissance se ralentit alors. Seuls, certains points privilégiés continuent à se développer et la surface qui était régulièrement mamelonnée se hérisse de petites cornes irrégulières serrées les unes contre les autres.

La face foliaire des explantats, plongée dans la gélose, ne prolifère généralement pas. Cette croissance dissymétrique semble mettre en évidence la polarité des tiges de Vigne, aussi avons-nous étudié cette propriété de la façon suivante : nous avons isolé des fragments de liber épais de quelques millimètres, que nous avons cultivés en les couchant à plat sur la gélose de manière que leurs deux extrémités soient dans des conditions comparables. Nous avons alors constaté que, dans ce cas, également, seule la partie radiculaire de l'explantat se développait (pl. VI, fig. B).

b. Croissance en présence d'hétéroauxine. — Lorsqu'on ajoute au milieu minéral

glucosé de l'acide indole ou naphthyle acétique, ou une autre hétéroauxine, on constate qu'à des concentrations inférieures à  $10^{-3}$ , ce produit paraît n'exercer aucune action. Les fragments se développent d'une manière identique à celle que nous venons de décrire. Par contre, pour une concentration légèrement supérieure, les cals se forment plus rapidement. Lorsque la concentration atteint  $10^{-2}$ , le développement des cals est renforcé et ils débordent largement de chaque côté du fragment initial (pl. VII, fig. A); en même temps les tissus préexistants émettent fréquemment des racines. Ces organes sont particulièrement abondants vers l'extrémité radiculaire des explantats ou immédiatement sous le cal. Ils s'enfoncent généralement dans la gélose, mais il arrive que, parfois, ils se dressent verticalement contre les parois du tube. Si le milieu renferme encore davantage d'hétéroauxine, par exemple  $10^{-1}$ , l'action rhizogène du produit est toujours très marquée et les cals deviennent encore plus volumineux, mais en même temps on observe des phénomènes d'intoxication qui se manifestent par un début de désorganisation des tissus néoformés. Ceux-ci deviennent plus fragiles, car leurs cellules se gonflent en tous sens et se transforment en éléments géants presque séparés les uns des autres. Cette action désorganisatrice de l'hétéroauxine est très irrégulière, certains cals restent normaux tandis que d'autres se transforment partiellement ou même parfois entièrement en tissus mous d'aspect translucide ou farineux formés de cellules géantes. Enfin, si la concentration atteint  $10^{-5}$  l'action toxique de l'hétéroauxine est encore plus intense si bien que tous les tissus néoformés deviennent rapidement des amas pulvérulents ou des masses de cellules translucides.

Cette action désorganisatrice paraît moins accentuée lorsqu'on utilise comme hétéroauxine de l'acide  $\alpha$  naphthyle acétique au lieu d'acide indole  $\beta$  acétique. C'est pourquoi, par la suite, nous avons uniquement employé l'acide  $\alpha$  naphthyle acétique.

c. Variations de la croissance en fonction de l'état des plantes expérimentées. — La Vigne, comme la plupart des végétaux des pays tempérés ou froids, a une végétation discontinue. C'est au printemps, à partir du mois de mai, dans la région parisienne, qu'elle manifeste la plus grande activité végétative et c'est à ce moment que l'élongation de ses tiges est la plus rapide. Toutefois, à l'inverse de beaucoup d'arbres qui achèvent leur croissance en quelques semaines, la Vigne continue à se développer pendant toute la belle saison et n'entre en repos qu'à l'automne au moment de la chute des feuilles. Dans certaines conditions d'ailleurs, par exemple dans les régions tropicales, ou encore en serre chauffée et convenablement éclairée, sa végétation est continue. Nous avons cherché s'il y avait une relation entre l'activité des fragments cultivés *in vitro* et celle de la plante dont ils provenaient. Pour cela, nous avons fait des prélèvements à diverses périodes de l'année. Nous avons ainsi constaté que les très jeunes bourgeons qui viennent de débourrer au printemps et n'ont pas encore plus de 2 à 3 centimètres de longueur sont incapables de proliférer *in vitro*. Il en est de même de l'extrême pointe de la tige adulte. C'est lorsqu'on prélève des explantats dans la région médiane de sarments qui ont atteint 40 à 50 centimètres de longueur et en voie de croissance très active, qu'ils se développent le plus rapidement *in vitro*. Des fragments, prélevés au cours de l'été, prolifèrent également avec vigueur, mais, en fin de saison, vers la mi-septembre, les cals sont plus petits et toute prolifération cesse lorsque les prélèvements sont faits après la chute des feuilles depuis le début d'octobre jusqu'en janvier. Il semble qu'une substance inhibitrice se forme alors dans la plante et l'empêche de proliférer car, pendant toute cette période, l'hétéroauxine n'exerce aucune action sur les tissus. Il paraît donc



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Fragment de tige de Vigne cultivé pendant deux mois en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $10^{-7}$  : la partie radicale située à l'extérieur du milieu s'est épaissie pour donner un cal volumineux qui déborde largement sur les tissus préexistants.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Fragment de tige de *Vitis coignetiae*, après deux mois de culture *in vitro*, sur un milieu contenant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5/10^{-7}$ .



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Fragment de tige de *Vitis Davidii* RAMON après deux mois de culture sur un milieu renfermant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-2}$ ; la prolifération n'est pas limitée uniquement à la partie radicale du fragment; la partie foliaire a également formé un cal au contact du milieu.



J. VINCENT, phot

FIG. B. — Fragments de tige de *Parthenocissus tricuspidata* ayant été cultivés pendant vingt jours dans un milieu renfermant  $10^{-2}$  d'acide naphthyle acétique. Remarquer que les deux extrémités ont produit des cals sensiblement égaux.

y avoir chez la Vigne une relation entre l'activité des fragments cultivés *in vitro* et celle de la plante dont ils proviennent.

d. Espèces diverses du genre *Vitis*. — Nous avons étudié de la même façon que la Vigne européenne un certain nombre de Vignes exotiques. Les unes étaient originaires d'Amérique du Nord : *V. cordifolia* LAM. *V. rupestris* SCHEELÉ, *V. riparia* MICHX., *V. arizonica* ENGEL et la variété « Noah » que l'on suppose être un hybride entre *V. riparia* MICHX. et *V. labrusca* L.; d'autres provenaient d'Asie, telles que *V. Coignetiae* PLANCH. et *V. Davidii* RAMON. Toutes les espèces américaines se comportent *in vitro* d'une manière comparable au *Vitis vinifera* dont nous venons de parler. On observe sur les tiges de ces espèces les mêmes actions excitoformatrices et rhizogènes de l'hétéroauxine et ces derniers présentent la même polarité que notre vigne indigène. Toutefois, les fragments de tige de *V. riparia* et *V. arizonica* se développent plus lentement et forment des cals beaucoup plus petits. Parmi les espèces asiatiques, *V. Coignetiae* prolifère d'une manière exubérante en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $5.10^{-7}$  et produit, en moins de deux mois, des cals de plus de 2 centimètres de diamètre (pl. VII, fig. B). Ces cals, comme ceux des espèces précédentes, n'apparaissent que sur la face radicale des explantats et ne se développent bien qu'en dehors du milieu de culture. Les vrilles de cette Vigne ensemencées comme des fragments de tige prolifèrent de la même façon.

Le mode de croissance de *Vitis Davidii* en présence d'hétéroauxine est, par contre, assez différent. Lorsqu'on ensemence des tronçons de tige de cette espèce dans un milieu renfermant des doses moyennes d'hétéroauxine, c'est-à-dire de l'ordre de 0,5 mg. par litre ( $5.10^{-7}$ ), de manière que leur face radicale soit située à l'air libre, le début de la croissance est marqué par un épaississement de la partie du sarment plongée dans le milieu nutritif. Au bout d'une quinzaine de jours, l'écorce éclate sous la poussée des tissus néoformés. Puis, ces derniers font irruption à l'extérieur du sarment par les fissures de l'écorce et s'accroissent rapidement au contact du milieu (pl. VIII, fig. A). La surface radiculaire située à l'air libre, à l'opposé, prolifère peu et les cals qui s'y forment demeurent plus petits que ceux des espèces précédentes. Lorsque les sarments sont piqués en position normale, c'est-à-dire de telle sorte que la face radiculaire soit au contact du milieu, seule la partie plongée dans la gélose prolifère. La polarité de cette vigne est donc encore très nette, bien que cette propriété paraisse moins accusée que chez les espèces précédentes.

B. Caractères anatomiques. — a. Structure de la tige normale de Vigne. — Avant d'étudier les caractères anatomiques des cultures de tissus, nous rappellerons d'abord rapidement la structure normale des tiges de *Vitis vinifera* que nous utilisons pour nos cultures. Une coupe transversale pratiquée dans la partie médiane d'un sarment âgé de deux à trois mois (fig. 2) montre, à la périphérie, un épiderme très mince, puis un parenchyme cortical, formé de quelques assises de cellules arrondies. Sous ce parenchyme cortical, des fibres péricycliques forment des flots séparés; en allant vers l'intérieur, on rencontre ensuite le parenchyme libérien, où se différencient très tôt plusieurs assises de fibres libériennes isolées les unes des autres par des rayons médullaires. Le liber est limité vers l'intérieur par une zone génératrice libéroligneuse qui est continue et entoure entièrement un large anneau de bois limitant lui-même la moelle formée d'un parenchyme de grosses cellules arrondies. L'épluchage du sarment, lors de la mise en culture, enlève tous les tissus externes jusqu'au niveau des fibres péricycliques, si bien qu'il ne

reste plus que le liber avec les fibres libériennes, la zone génératrice libéroligneuse, le bois et la moelle.

b. Structure des néoformations produites au cours de la culture. — Pour étudier la structure anatomique des tissus de Vigne ayant proliféré *in vitro* nous avons fait des coupes radiales dans des fragments de tige cultivés pendant quinze jours dans un milieu renfermant de l'hétéroauxine à la concentration de  $10^{-6}$ . Ces coupes radiales passaient

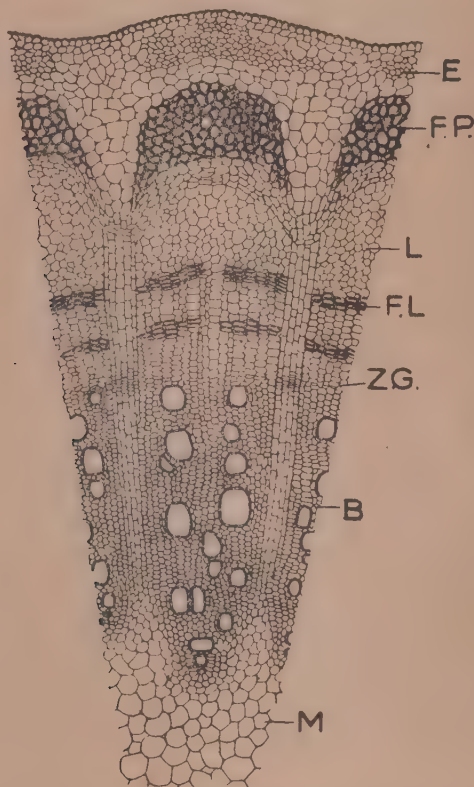


FIG. 2. — Structure anatomique d'un sarment de *Vitis vinifera* L. (d'après VIALA). E : écorce; F P : Fibres péricycliques; L : Parenchyme libérien; F l : Fibres libériennes; Z G : Zone génératrice; B : Bois; M : Moelle.

par l'axe de la tige et étaient pratiquées sur toute la longueur de l'explantat. L'examen de ces coupes nous a montré que le parenchyme libérien et le cambium proliféraient pour former une masse de parenchyme homogène formé de petites cellules en voie de division. La zone génératrice, dont l'activité était très intense, avait contribué non seulement à la formation du cal, mais encore à l'épaississement de la partie radulaire de la tige en donnant naissance, vers l'extérieur, à du parenchyme libérien et vers l'intérieur, non pas à du bois, mais à du parenchyme vasculaire au sein duquel s'étaient différenciés quelques vaisseaux aberrants.

Quinze jours plus tard, nous avons constaté que l'aspect du cal qui, jusque là, s'accrois-

saît régulièrement, commençait à se modifier. Une série de cellules situées le long d'une ligne sinueuse prolongeant l'assise génératrice libéroligneuse de la tige à l'intérieur du cal en s'infléchissant au départ vers l'intérieur du sarment commençait à se recloisonner transversalement. Il se formait ainsi vers la périphérie du cal une zone génératrice continue qui entourait entièrement la partie centrale. Cette zone génératrice ne tardait pas à produire des formations cribrovasculaires composées de vaisseaux aberrants et de tubes criblés. Mais, la partie vasculaire de ces formations était orientée vers l'extérieur du cal, tandis que la partie libérienne, elle, était située vers l'intérieur de celui-ci (fig. 3), c'est-à-dire que leur orientation était inversée par rapport à celle d'une tige normale.

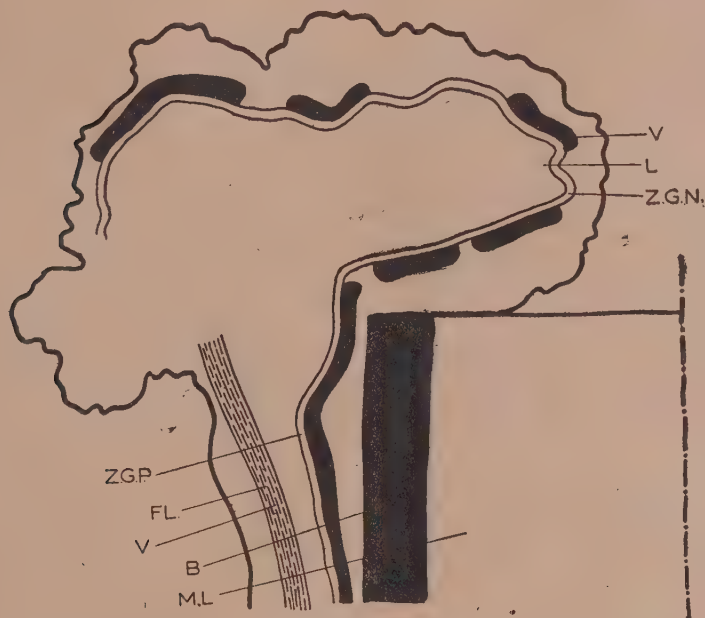


FIG. 3. — Structure schématique du cal formé par un fragment de tige de *Vitis vinifera* L. après un mois de culture. FL : Fibres libériennes ; ZGP : Zone génératrice préexistante ; V : Vaisseaux néoformés ; ZGN : Zone génératrice néoformée ; ML : Moelle ; B : Bois ; L : Tubes criblés.

Remarquer que le tissu cambial a proliféré pour donner naissance à l'intérieur du fragment à une mince bande de parenchyme vasculaire V, si bien que la zone génératrice ZGP se trouve maintenant séparée du bois préexistant. La prolifération a surtout été abondante vers la face radicale du fragment où s'est formé un cal qui débordé sur les tissus préexistants. En outre, il s'est différencié à la périphérie de ce cal une zone génératrice néoformée ZGN qui se raccorde à la zone génératrice préexistante et fonctionne de la même manière ; mais par suite du sens de sa courbure dans le cal, cette zone génératrice se trouve inversée puisqu'elle produit des vaisseaux V, vers l'extérieur des tissus et des tubes criblés L, vers l'intérieur.

Nous avons observé que ce phénomène était particulièrement net avec *Vitis Coignetiae* RAMON. Chez *Vitis vinifera* L., nous avons observé des faits analogues, mais la zone génératrice était généralement discontinue et la lignification n'était vraiment importante qu'en face du bois préexistant.

Très souvent, les bords internes du cal annulaire se rejoignent et se soudaient avant que le parenchyme n'ait commencé à se différencier. En ce cas, les coupes longitudinales

présentaient l'aspect suivant : le cal recouvrait uniformément toute la partie supérieure de la tige. Comme dans le cas précédent, il s'y formait une zone génératrice prolongeant le cambium, s'incurvant au-dessus du bois et de la moelle, et rejoignant l'autre partie symétrique (fig. 4). En même temps, à la partie supérieure, se différenciait une autre zone génératrice qui fonctionnait de la même manière, si bien que, dans ce cas, comme dans le précédent, le cal se trouvait entouré vers la périphérie d'une couche irrégulière de cellules lignifiées. Ces formations cribrovasculaires inversées rappellent celles que GAUTHERET a observé dans des cals qui se forment sur des morceaux de parenchyme

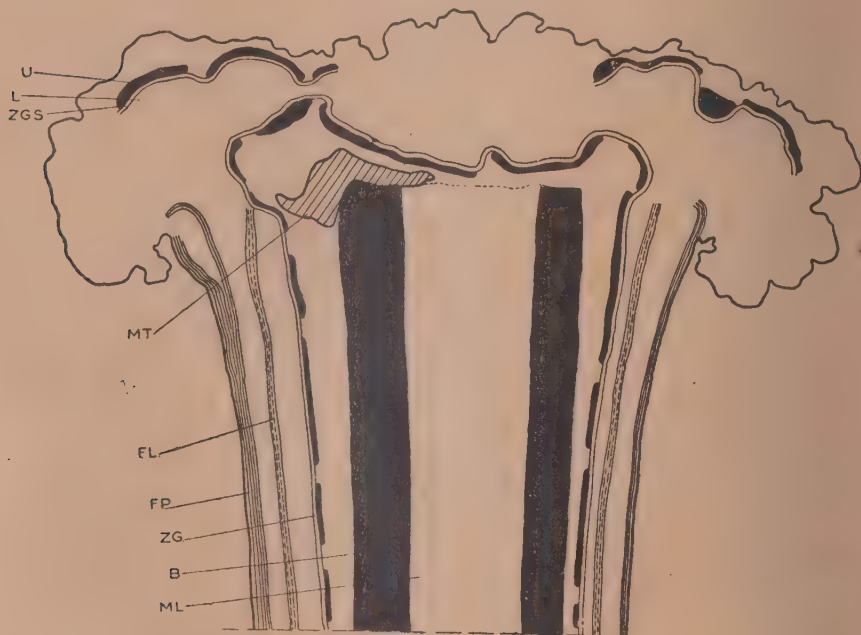


FIG. 4. — Structure schématique du cal formé par un fragment de tige de *Vitis Coignetiae* PLANCH. après deux mois de culture. FP : Fibres péryciques; FL : Fibres libériennes; B : Bois; ZG : Zone génératrice; ZGS : Zone génératrice superficielle; ML : Moelle; MT : Méat; L : Liber; V : Vaisseaux.

Le cal ayant continué à proliférer recouvre tout le fragment. On observe maintenant à sa périphérie, deux zones génératrices l'une profonde se raccordant à la zone génératrice préexistante, l'autre superficielle sans communication avec celle-ci; toutes deux produisent des vaisseaux vers l'extérieur du cal et des tubes criblés vers l'intérieur.

libérien de Carotte cultivés *in vitro*; dans ce cas également, la zone génératrice qui apparaît dans le cal donne naissance à des vaisseaux vers l'extérieur et à du liber vers l'intérieur. Mais, dans la Carotte, cette disposition est instable, car, par la suite, la zone génératrice qui sépare le parenchyme vasculaire du liber s'étend autour des îlots de parenchyme vasculaire, de manière à l'entourer complètement et il se forme ainsi des nodules libéroligneux qui ont une structure normale (fig. 5) tandis que, dans la Vigne, ces formations sont parfaitement stables.

II. GENRE *PARTHENOCISSUS*. — Le genre *Parthenocissus* comprend une dizaine d'espèces

répandues dans les régions tempérées de l'Asie et de l'Amérique du Nord. Les tiges de ces plantes atteignent une très grande longueur, tout en restant excessivement minces. Plusieurs sont cultivées dans un but ornemental sous le nom de Vigne-vierge.

1. *Parthenocissus tricuspidata* (SIEB. et ZUCC) PLANCH. — Comme pour la Vigne, nous considérons tout d'abord la morphologie externe, puis la structure anatomique des tissus cultivés.

A. *Morphologie externe.* — a. Croissance normale. — Lorsqu'on prélève des fragments de jeune tige de cette Vigne-vierge et qu'on les plante verticalement à la surface d'une solution minérale glucosée ne renfermant pas d'hétéroauxine, ils ne se développent pas de manière sensible; l'examen de coupes anatomiques pratiquées dans ces fragments

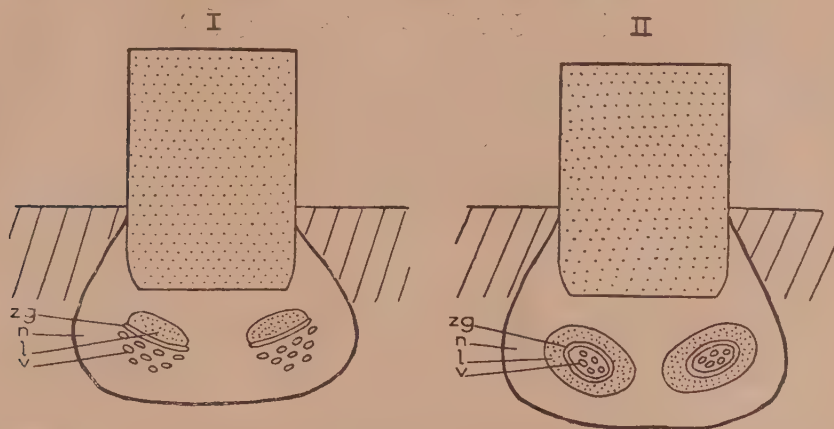


FIG. 5. — Structure schématique des néoformations produites par un fragment de parenchyme libérien de Carotte cultivé *in vitro*. Le fragment primitif (I) a produit un tissu homogène au sein duquel s'est différencié une zone génératrice Z G produisant du liber L vers l'intérieur et des vaisseaux V vers l'extérieur; cette structure est instable et bientôt (II), la zone génératrice entoure entièrement la région vasculaire pour former des nodules normalement constitués (d'après GAUTHERET).

deux mois après la mise en culture ne permet d'y déceler aucun changement de structure. Les tissus de la Vigne-vierge paraissent donc incapables de croître normalement *in vitro*. Ils ne peuvent se développer si on ne leur fournit pas d'hétéroauxine.

b. Croissance en présence d'hétéroauxine. — Par contre, lorsqu'on cultive des tissus de cette plante en présence d'acide  $\alpha$  naphthyle acétique, on observe des faits très différents. Jusqu'à une concentration voisine de  $5 \cdot 10^{-8}$ , ce produit n'exerce pas d'action et les fragments de tige demeurent semblables aux témoins. Mais, lorsque la concentration en hétéroauxine est comprise entre  $5 \cdot 10^{-8}$  et  $10^{-7}$ , les sarments commencent à se développer et en une quinzaine de jours un cal apparaît à chaque extrémité de la tige piquée verticalement dans la gélose quelle que soit son orientation (pl. VIII, fig. B). Les deux cals, légèrement chlorophylliens, s'accroissent tout d'abord de façon égale, puis celui qui prolifère à l'intérieur de la solution nutritive augmente de volume beaucoup plus rapidement que l'autre situé à l'air libre. En deux mois, il atteint une épaisseur d'environ 20 millimètres alors que l'autre ne dépasse pas 5 millimètres. En même temps, l'hétéroauxine manifeste son action rhizogène qui se traduit par l'apparition de quelques racines

le long du fragment primitif. Toutefois, cette rhizogénèse est beaucoup moins intense que celle que l'on observe chez la Vigne et certains explantats n'en produisent pas. Lorsque la concentration en substance de croissance est comprise entre  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ , la prolifération se généralise à toute la partie de la tige qui est au contact du milieu. Cette partie commence par se gonfler puis, au bout d'une quinzaine de jours, l'écorce éclate sous la poussée des tissus néoformés qui s'accroissent avec une rapidité surprenante et en un mois viennent s'écraser sur les parois du tube (pl. IX. fig. A). En ce cas, seule la partie inférieure de la tige plongée dans la gélose se développe, l'autre extrémité ne prolifère pas. Lorsque la culture est faite à partir de très jeunes tiges de 2 millimètres de diamètre, la partie située à l'air libre ne se développe pas du tout et finit par se dessécher. La partie supérieure de tiges plus épaisses ne meurt pas, mais produit un cal très réduit dont l'accroissement cesse rapidement. Seules, des tiges très épaisses âgées de plusieurs années sont capables de produire des cals importants à l'extérieur du milieu.

Enfin, quand la concentration en hétéroauxine atteint  $10^{-5}$ , le cal qui se forme au contact du milieu se désagrège rapidement et l'examen microscopique des tissus dissociés montre qu'ils sont en grande partie formés de cellules géantes.

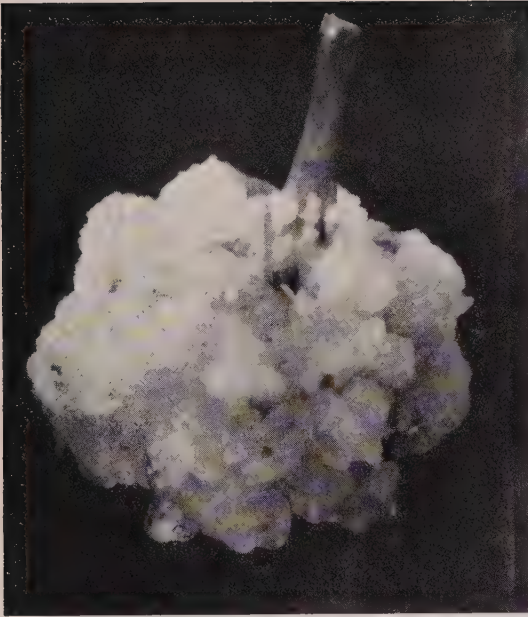
Lorsqu'on ensemence des morceaux de pétiole, ils se comportent de la même façon, c'est-à-dire que, si le milieu renferme de l'hétéroauxine, les parties situées à son contact prolifèrent et forment des cals volumineux; toutefois, nous n'avons jamais observé la production de racines sur ces organes.

Nous avons également tenté de cultiver des fragments de limbe. Pour cela, après stérilisation à l'alcool, nous les avons découpés en petits carrés de 15 millimètres de côté que nous plantons dans la gélose nutritive. Nous avons constaté que, dans ces conditions, seules les grosses nervures prolifèrent et forment sur leurs extrémités sectionnées de petits nodules parenchymateux analogues à ceux qui se développent sur les tiges.

Le mode de croissance des tiges de Vigne-vierge s'oppose à celui des tiges de Vigne par son manque total de polarité. Les phénomènes que nous venons de décrire se reproduisent de manière identique quelle que soit l'orientation du fragment par rapport au milieu. Les cals qui apparaissent à chacune des extrémités des tiges jeunes, lorsqu'on les cultive en présence de faibles quantités d'hétéroauxines présentent la même structure et des fragments de liber déposés à plat sur le milieu nutritif prolifèrent également sur toute leur surface et non uniquement du côté radical comme ceux de liber de Vigne.

c. Variations de la croissance en fonction de l'état des plantes expérimentées. — Comme la Vigne, la Vigne-vierge entre en végétation au début de mai; ses tiges s'accroissent durant tout l'été, et la croissance commence à se ralentir fin septembre, pour s'arrêter complètement un peu avant la chute des feuilles, au début d'octobre. Nous avons cherché s'il y avait une relation entre l'activité de la plante et la croissance de fragments d'organes *in vitro* en faisant des prélèvements à diverses périodes de l'année. Nous avons remarqué que des explantats mis en culture à partir de la mi-octobre au moment de la chute des feuilles, lorsque la plante entre en repos, ne se développent plus. Cet arrêt de développement dure jusqu'au printemps suivant.

B. Caractères anatomiques. — a. Structure de la tige normale. — La tige de Vigne-vierge possède une structure anatomique qui rappelle beaucoup celle de la Vigne. Aussi, la décrivons-nous très rapidement: lorsqu'on fait des coupes dans la partie moyenne d'un sarment âgé d'un mois ou deux, tel qu'il se présente lorsqu'on le met en culture dans le courant de l'été, on remarque à l'extérieur un épiderme beaucoup plus épais



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Fragment de tige de *Parthenocissus tricuspidata*. Au bout de deux mois de culture dans un milieu renfermant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $10^{-6}$ . Seule, la partie plongée dans le substratum s'est développée pour former un cal très volumineux.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Fragment de tige de *Rubus fruticosus* après deux mois de culture dans un milieu contenant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ . On remarque qu'il a produit un cal à chacune de ses extrémités.



que celui d'une tige de Vigne, se détachant très facilement. Sous l'épiderme, on rencontre le parenchyme cortical également très épais formé de cellules arrondies; le cylindre central est limité par un anneau de liber à la périphérie duquel on distingue quelques îlots de fibres péricycliques. Cet anneau de liber est interrompu par de larges rayons médullaires formés de grandes cellules allongées, dont certaines renferment des raphides d'oxalate de calcium; le cylindre de bois entièrement lignifié est encore assez mince; il entoure la moelle, formée de grosses cellules arrondies. Au cours du prélèvement

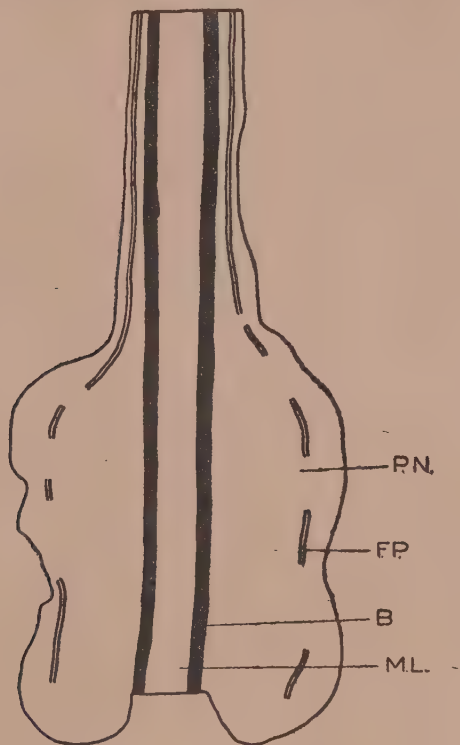


FIG. 6. — Coupe schématique d'un fragment de tige de *P. tricuspidata* ayant été cultivé pendant vingt-quatre jours en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $10^{-6}$ . FP : Fibres péricycliques; B : Bois; ML : Moelle; PN : Parenchyme néoformé.

Seule la partie plongée dans le milieu s'est développée. Les parenchyms cortical et libérien et le cambium ont participé à la formation du cal. Les fibres péricycliques se trouvent dissociées par la prolifération des tissus.

aseptique, on élimine simplement l'épiderme qui se détache très aisément des autres tissus.

b. Structure de fragments de tige cultivés *in vitro*. — Pour étudier le mode de croissance des tissus de la tige de Vigne-vierge cultivés *in vitro*, nous avons ensemencé des tronçons de cet organe longs d'environ 2 centimètres, en les piquant verticalement dans un milieu qui contenait de l'hétéroauxine à la concentration de  $10^{-6}$ . Les explantats étaient à demi enfoncés dans la gélose, de telle sorte qu'une longueur de 1 centimètre plongeait dans le substratum. En pratiquant tous les huit jours des coupes longitudinales radiales, sur des fragments provenant du même sarment (fig. 6), nous avons remarqué que tous

les tissus périphériques jusqu'au bois, c'est-à-dire parenchyme cortical, libérien et cambium, participent à la formation du cal. La couche des fibres libériennes se trouve désorganisée et celles-ci sont dispersées au milieu du parenchyme résultant de la prolifération des éléments non différenciés de l'écorce et du liber.

Ce parenchyme néoformé ne demeure pas complètement indifférencié, car on y rencontre, réparties au hasard, des cellules à raphides et d'autres qui élaborent des tanins, mais il n'y apparaît aucune formation cribrovasculaire, même après deux mois de culture.

## 2. *Parthenocissus quinquefolia* (L.) PLANCH. :

A. *Morphologie externe.* — Le *Parthenocissus quinquefolia* est systématiquement fort voisin de *P. tricuspidata*. Le mode de développement de ses tiges *in vitro* est cependant assez différent. N'ayant pas cultivé les tissus de cette espèce sans hétéroauxine, nous ignorons s'ils peuvent se développer normalement sur des milieux ne renfermant que des sels minéraux et du glucose.

Nous avons constaté que lorsqu'on met en culture des fragments de tige de cette plante dans des milieux renfermant de l'acide naphthyle acétique à des concentrations comprises entre  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ , la partie plongée dans la gélose commence par se gonfler en même temps qu'un cal apparaît à l'extrémité opposée. Mais, bientôt, l'hétéroauxine provoque une rhizogénèse beaucoup plus intense que chez le *P. quinquefolia*. Des paquets de racines enchevêtrées se forment tout le long de la tige. Cette rhizogénèse inhibe alors la croissance des cals qui ne se développent plus que très lentement. Mais, au contact de l'acide naphthyle acétique, contenu dans le milieu, les racines augmentent de diamètre et se tuméfient; en outre, celles qui se trouvent en contact se soudent entre elles pour former des masses de tissus désorganisés ayant l'aspect de cals qui naissent directement sur la tige.

B. *Caractères anatomiques.* — La structure anatomique des tiges de *P. quinquefolia* est presque identique à celle des tiges de *P. tricuspidata*; aussi, nous ne la décrirons pas à nouveau. Celle des néoformations produites par une tige de *P. quinquefolia* ayant proliféré *in vitro* présente également beaucoup d'analogie avec celle obtenue avec le *P. tricuspidata* que nous avons précédemment décrite. Tous les tissus externes de la tige depuis l'écorce jusqu'au bois, c'est-à-dire le parenchyme cortical, le parenchyme libérien et le cambium prolifèrent et contribuent à la formation du cal. Les tissus néoformés demeurent entièrement indifférenciés. Jamais nous n'y avons rencontré d'éléments cribrovasculaires comparables à ceux qui apparaissent dans les cals de Vigne.

Les cals formés par les racines sont, par contre, assez différents. On y reconnaît, noyées dans un parenchyme composé de grandes cellules irrégulières, tous les éléments d'une racine normale entièrement désorganisés. L'écorce, qui est déjà très épaisse dans la racine normale, s'est considérablement accrue. C'est elle qui a produit un parenchyme indifférencié dans lequel on rencontre, disposés au hasard, les vestiges du cylindre central.

III. GENRE *Cissus*. — Les *Cissus* remplacent les Vignes dans la flore des régions tropicales. Beaucoup d'espèces possèdent des racines tubérifiées ou des tiges aériennes renflées, indices d'une forte activité cambiale. Aussi, nous a-t-il paru intéressant de tenter la culture de leurs tissus. Nous avons étudié les deux espèces suivantes *Cissus incisa* (TORR et GRAY.) Desm. et *C. discolor* WENT.

### 1. *Cissus incisa* (TORR. et GRAY.) DESM. :

A. *Morphologie externe*. — Cette espèce possède le long de ses racines des renflements tuberculeux de la dimension d'un œuf de pigeon. Les tiges, par contre, sont minces et rampantes comme celles de la Vigne-vierge. Nous avons cultivé à la fois des fragments de racines et de tissus de tiges mais uniquement en présence d'hétéroauxine, si bien que nous ignorons si ces tissus sont susceptibles de proliférer spontanément sans facteurs de croissance.

Des tranches de racines épaisses de 1 centimètre déposées à la surface d'un milieu nutritif contenant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5 \cdot 10^{-7}$ , prolifèrent vigoureusement. Leur face qui est en contact avec le substratum, produit rapidement d'énormes mamelons de parenchyme, tandis que l'autre face à l'air libre ne se développe que fort peu en formant un cal situé à l'emplacement de la zone génératrice. Des tronçons de tige prélevée au printemps et placés dans le même milieu se développent d'une manière comparable, c'est-à-dire qu'au contact du substratum ils produisent un épais bourrelet, tandis que la croissance de la partie située à l'air est très réduite et se limite à de faibles excroissances sur la surface de section.

L'orientation des fragments ne paraît pas influencer sur le développement des tissus de cette espèce qui, comme ceux des *Parthenocissus*, paraissent dépourvus de polarité.

B. *Caractères anatomiques*. — a. *Structure des organes normaux*. — Les tubercules du *Cissus incisa* proviennent de l'hypertrophie du parenchyme vasculaire de la racine; des coupes transversales pratiquées dans ces organes montrent à la périphérie un épiderme subérifié, puis un parenchyme cortical épais formé de plusieurs assises de grosses cellules arrondies. Sous ce parenchyme cortical des fibres péricycliques forment des îlots séparés. On rencontre ensuite en allant vers l'intérieur d'épaisses assises de parenchyme libérien indifférencié. Le liber est limité vers l'intérieur par la zone génératrice libéroligneuse qui est continue et entoure entièrement un mince cylindre de bois, la moelle très réduite ne comporte que quelques assises de cellule.

La structure des tiges est en tout point comparable à celle des deux *Parthenocissus* que nous avons étudiés.

b. *Structure anatomique de fragments d'organes cultivés in-vitro*. — Une coupe longitudinale pratiquée dans une tranche de racine ayant été cultivée pendant deux mois en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5 \cdot 10^{-7}$  montre qu'au contact de l'hétéroauxine contenue dans le milieu l'écorce et le liber ont proliféré de façon diffuse pour former des masses volumineuses de parenchyme. La prolifération a surtout été intense au voisinage de l'assise génératrice et le cal formé à cet endroit déborde largement sur le bois. Ces néoformations demeurent constamment indifférenciées.

### 2. *Cissus discolor* WENT. :

A. *Morphologie externe*. — Le *Cissus discolor* est une petite liane des régions indomalaises que l'on cultive en serre dans notre pays. Ses rameaux y demeurent toujours très grêles et dépassent rarement une longueur de 2 à 3 mètres.

a. *Croissance normale*. — Si on ensemence des fragments de tige de cette espèce de 1 à 2 centimètres de long dans des milieux ne renfermant que des sels minéraux et du glucose, on constate qu'ils restent vivants pendant plusieurs mois, mais ne produisent

aucune néoformation. L'examen anatomique des explantats et leur pesée après deux mois de culture montrent qu'ils ne se sont pas modifiés.

b. Croissance en présence d'hétéroauxine. — Si, au lieu de placer les fragments de tiges sur de simples solutions minérales glucosées, on les plante dans des milieux renfermant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $10^{-7}$ , on constate qu'ils se développent très lentement et forment au contact du substratum un bourrelet de parenchyme légèrement coloré en rose susceptible de verdier à la lumière. Ce cal se développe uniquement à la surface du substratum, où il s'étale en mince croute. La partie du sarment profondément enfoncée dans la gélose se modifie très peu au cours de la culture et la partie aérienne finit par mourir et se dessécher. Lorsque le milieu renferme dix fois plus d'hétéroauxine ( $10^{-6}$ ), les néoformations sont plus volumineuses et toute la partie de la tige immergée dans la gélose se gonfle pour former le cal qui se développe en profondeur et ne reste plus localisé à la surface de la gélose. En outre, les explantats émettent parfois quelques racines.

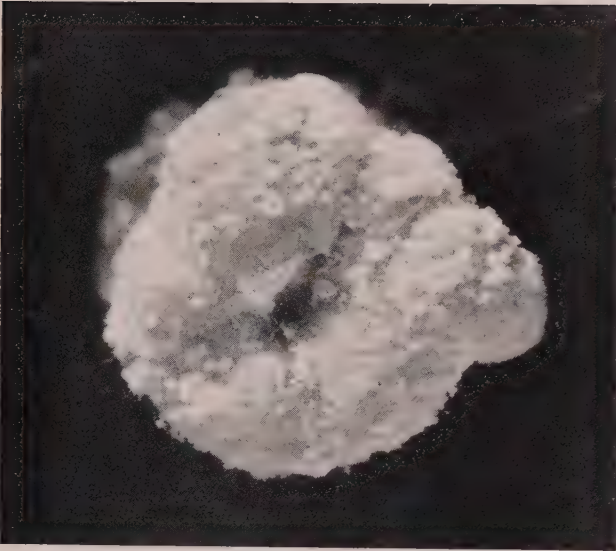
Des fragments de pétiole ensemencés de la même façon prolifèrent d'une manière analogue; toutefois, les néoformations demeurent beaucoup plus réduites.

Les phénomènes que nous venons de décrire se reproduisent d'une manière identique quelle que soit l'orientation des fragments. Les proliférations apparaissent toujours uniquement au contact du milieu et se développent surtout en surface. Les tissus de tige de cette espèce comme ceux du *Cissus incisa* ne paraissent pas doués de polarité de croissance.

c. Influence de l'état des plantes expérimentées sur la croissance *in vitro*. — Dans le but de vérifier s'il y avait une relation entre l'activité des fragments cultivés *in vitro* et celle de la plante dont ils proviennent, nous avons effectué des prélèvements de tissus de tige à diverses périodes de l'année et nous avons constaté que, contrairement à ce que l'on observe avec les autres Ampélidées, ils se développaient toujours régulièrement en n'importe quelle saison. Le *Cissus discolor*, étant une plante tropicale, ne peut vivre sous nos climats qu'en serre chaude, sa végétation ne s'arrête pas réellement au cours de l'hiver, mais se ralentit simplement; ce ralentissement semble sans effet sur la prolifération des tissus de la tige *in-vitro*.

B. Caractères anatomiques. — a. Structure de la tige normale. — La tige normale de *Cissus discolor* a une structure légèrement différente de celle des autres Ampélidées que nous avons étudiées. Elle est beaucoup moins lignifiée. L'épiderme qui se subérise très rapidement recouvre un parenchyme cortical très épais sous lequel on rencontre de petits flots de fibres péricycliques. Le liber, formé de quelques assises de cellules, ne renferme pas de fibres libériennes; il est limité vers l'intérieur par une zone génératrice libéro-ligneuse continue qui entoure un large cylindre de parenchyme vasculaire, où l'on trouve de grands vaisseaux disposés en fibres radiales et entourées d'une couronne de cellules ligneuses. Le parenchyme vasculaire est séparé de la moelle par un anneau continu de cellules ligneuses.

b. Structure de fragments de tige cultivée *in-vitro*. — Lorsqu'on cultive pendant deux mois des fragments de tiges de *Cissus discolor*, en présence d'hétéroauxine, et que l'on pratique des coupes transversales dans la partie qui a proliféré, on constate que tous les tissus peu différenciés, c'est-à-dire le parenchyme cortical, le parenchyme libérien et le parenchyme vasculaire, ont proliféré. La structure de la tige est profondément



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Cal formé sur un fragment de tige de Ronce après trois mois de culture *in vitro*. La croissance, d'abord très active, s'est ralentie et ne se manifeste plus que par la formation de petites pustules isolées.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Fragment de tige d'Aubépine cultivé pendant deux mois dans un milieu contenant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ .



modifiée par la croissance. Seule, la moelle entourée d'une rangée de cellules ligneuses est encore en place. Tous les autres éléments différenciés, vaisseaux, fibres péricycliques, se trouvent éparpillés au hasard au milieu des néoformations.

CONCLUSION. — En résumé les Lianes de la famille des Ampélidées, à laquelle appartiennent toutes les plantes que nous venons d'étudier, constituent un matériel tout à fait exceptionnel pour réaliser des cultures de tissus. Presque toutes fournissent des cultures très vigoureuses dont le mode de développement est assez varié. Certaines présentent une croissance étroitement polarisée avec formation de cals uniquement sur la face radicale (Vigne européenne, Vigne américaine), d'autres ont au contraire une croissance dépourvue de polarité avec formation d'organes en des régions quelconques, des fragments ensemencés (*Parthenocissus*), d'autres enfin (*Vitis Davidii*) ont un mode de développement intermédiaire entre ces deux types. D'autre part, le contact du milieu inhibe très fortement la prolifération des tissus de certaines espèces (Vigne Européenne, Vigne américaine), tandis qu'il semble favoriser le développement des tissus de certaines autres (*Parthenocissus*).

#### b. ROSACÉES.

La famille des Rosacées comprend un certain nombre de plantes sarmenteuses réparties dans les genres *Rubus* et *Rosa*. Ce sont, pour la plupart, des Lianes extrêmement vigoureuses, dont les tiges s'accroissent en longueur avec une grande rapidité.

I. GENRE *RUBUS*. — Le genre *Rubus* comprend de très nombreuses d'espèces croissant dans les régions tempérées de l'hémisphère nord. Ce sont presque toutes des Lianes épineuses dont les tiges ont une durée assez courte. Après s'être développées rapidement pendant quelques années, elles meurent et sont remplacées par de nouvelles pousses émises par la souche. Nous avons cultivé les tissus de trois espèces *R. fruticosus* L., *R. kinashii* LEV. et *R. reflexus* KER. que nous allons étudier successivement.

1. *Rubus fruticosus* L. — La tige de Ronce possède une écorce très mince si bien que la zone génératrice se trouve située très près de l'épiderme. Il faut donc prendre de grandes précautions pour ne pas la léser au cours des opérations de stérilisation.

A. *Morphologie externe*. — N'ayant pas étudié de façon systématique l'action de l'hétéroauxine sur les tissus de cette espèce, nous ignorons si elle est susceptible de se développer *in vitro* sans facteur de croissance.

La croissance de fragments de tige de cette espèce, plantés verticalement, à la surface de milieux renfermant de l'acide naphthyle acétique à des concentrations comprises entre  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ , se manifeste au bout d'une huitaine de jours par la formation d'un mince bourrelet de parenchyme qui apparaît tout d'abord à l'air libre sur la surface de section de la zone génératrice; puis, peu à peu, le liber prolifère également. Mais cette prolifération paraît limitée aux deux extrémités du tronçon qui s'épaississent considérablement, alors que sa partie médiane s'accroît relativement peu (pl. IX, fig. B). Deux cals symétriques se forment ainsi et s'accroissent lentement, si bien qu'après deux mois de culture les deux extrémités du segment de tige se sont recouverts de tissus néoformés. La croissance se ralentit alors et seules certaines régions superficielles du cal situées à l'air libre, s'accroissent encore pour former de minces pustules qui donnent au tissu un aspect feutré (pl. X, fig. A).

Ce mode de croissance symétrique des tiges semble indiquer une absence complète

de polarité. Pour nous assurer que ces organes en sont bien dépourvus, nous les avons cultivés en les couchant à plat sur le milieu au lieu de les enfoncer verticalement. Nous avons alors constaté que, dans ce cas également, la croissance est surtout active à chacune des extrémités de l'explantat. Cependant, elle n'est pas strictement limitée à ces régions et toute la partie située au contact du milieu prolifère et forme de petits mamelons parenchymateux. Toutefois, le développement de ces néoformations ne paraît soumis à aucune polarité. Nous n'avons fait des prélèvements de tiges de cette espèce que pendant la belle saison, si bien que nous ignorons si des fragments d'organes mis en culture au moment de l'arrêt de la végétation en automne sont susceptibles de se développer *in-vitro*.

B. *Caractères anatomiques*. — a. *Structure anatomique de la tige normale*. — La tige de *Rubus fruticosus* possède un épiderme épais produisant de nombreux aiguillons. Cet épiderme recouvre une écorce très mince sous laquelle on rencontre un anneau presque

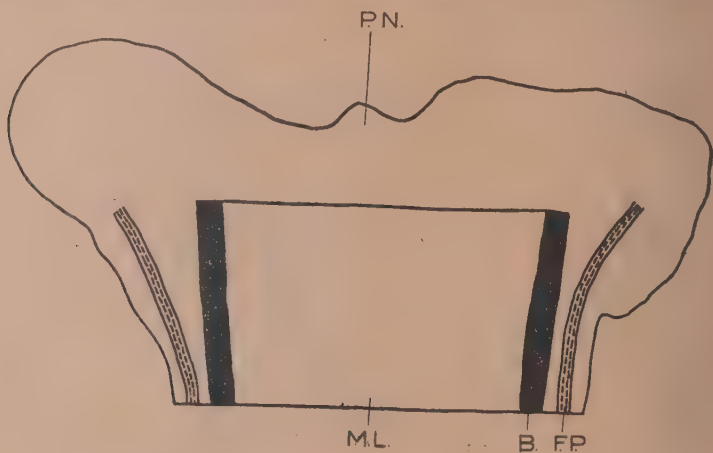


FIG. 7. — Coupe schématique du cal développé sur l'extrémité radicale d'un fragment de tige de *Rubus fruticosus* cultivé pendant deux mois en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $10^{-6}$ . F'P : Fibres péri-cycliques; B : Bois; Ml : Moelle; P N : Parenchyme néoformé.

Le tissu cambial a proliféré pour former un cal de parenchyme indifférencié qui déborde largement sur les tissus préexistants.

continu de fibres péri-cycliques sclérifiées; le cylindre central comprend un liber très mince formé d'un parenchyme annulaire épais de quelques assises de cellules et interrompu par des rayons médullaires; la zone génératrice est continue et produit vers l'intérieur un mince cylindre de bois; le centre de la tige est composé de moelle formée d'un parenchyme à grandes cellules arrondies.

b. *Structure de la tige cultivée in-vitro*. — Des coupes longitudinales effectuées dans des fragments de tige après deux mois de culture montrent (fig. 7) que ces néoformations prennent naissance surtout à partir du cambium. Les quelques assises de parenchyme libérien prolifèrent également et concourent à la formation du cal. Ce dernier est tout d'abord composé d'un parenchyme très homogène, puis un certain nombre de cellules se mettent à sécréter des tannins. Mais, aucun des éléments de ce parenchyme ne se transforme en vaisseaux ou en tubes criblés, si bien qu'il demeure très peu différencié

2. *Rubus kinashii* LEV. — Cette Ronce est originaire du Japon. Ses tiges colorées en

rouge et recouvertes d'une pruine blanche la rendent ornementale, ce qui explique qu'elle est parfois plantée dans les jardins. La grande vigueur de cette plante nous a incité à tenter de cultiver ses tissus. Nous avons observé un mode de développement en tout point comparable à celui que nous venons de décrire. En présence d'hétéroauxine à la concentration de  $10^{-6}$ ; nous avons observé la formation de cals aux deux extrémités des fragments ensemencés; les tissus néoformés se développaient aussi bien à l'intérieur du milieu qu'à l'air libre; les tiges semblaient dépourvues de polarité de développement; enfin, la structure anatomique des néoformations était comparable à celle du *Rubus fruticosus*.

3. *Rubus reflexus* KER. — *Rubus reflexus* est une liane originaire du Sud de la Chine, que l'on cultive en serre; de cette manière, sa végétation est continue, mais cependant beaucoup moins active que celle des deux espèces que nous venons de décrire. Elle a sur ces dernières l'avantage d'être utilisable en n'importe quelle saison; ses tiges, très grêles, dépassent rarement trois ou quatre millimètres d'épaisseur. La position très superficielle de l'assise génératrice oblige à prendre de grandes précautions au cours de l'épluchage.

A. *Morphologie externe*. — a. Croissance normale. — Des fragments de tiges de cette espèce mis en culture sur des solutions gélosées ne renfermant que du glucose et des sels minéraux se développent à peine. La partie de l'explantat plongée dans le milieu se gonfle légèrement et parfois il produit des mamelons irréguliers localisés à la surface de la gélose, mais ces néoformations sont toujours très réduites et cessent très vite de s'accroître.

b. Croissance en présence d'hétéroauxine. — Lorsque le milieu utilisé pour la culture contient de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ , on observe une croissance plus active. Les explantats prolifèrent lentement en formant de petits cals qui, exposés à la lumière, deviennent légèrement chlorophylliens et se colorent en rose par formation d'anthocyanes ou de produits analogues. Ces cals apparaissent à la surface de la gélose; ils sont situés latéralement sur le fragment qu'ils ne tardent pas à entourer d'un anneau irrégulier de parenchyme à demi plongé dans le milieu; cet anneau s'étale et forme une mince croûte à la surface du milieu. La partie du fragment située à l'air libre prolifère également sur la surface de section et produit un cal analogue à celui qui apparaît sur les cotés, bien que beaucoup moins volumineux.

Le mode de développement des fragments de tige de cette espèce ne paraît pas être influencé par l'orientation des fragments. Les proliférations que nous venons de décrire apparaissent sur les tronçons de tige quelle que soit leur orientation. Lorsqu'on prépare les cultures, on peut indifféremment enfoncer la face radiculaire, ou la face foliaire, dans le milieu. Dans les deux cas, les cals qui se forment sont identiques; les tissus des tiges de cette espèce paraissent donc dépourvues de polarité.

c. Influence de l'état des plantes expérimentées sur la croissance *in vitro*. — Le *Rubus reflexus* n'étant pas une plante rustique sous nos climats, on est obligé de le cultiver en serre tempérée; dans ces conditions, on le soustrait aux variations saisonnières de température, et sa végétation est continue. Nous avons fait des prélèvements de tiges aussi bien en hiver qu'en été, sans noter de différence dans leur mode de croissance *in vitro*.

B. *Structure anatomique*. — La structure anatomique des tiges de *Rubus reflexus* est

très voisine de celle de *Rubus fruticosus*; aussi, nous ne la décrirons pas. Des coupes longitudinales effectuées dans des tronçons de tige cultivés pendant deux mois en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $5 \cdot 10^{-7}$  montrent que les cals se forment par suite de la prolifération de la zone génératrice. Ils ne demeurent pas indifférenciés comme les précédents. Après un mois ou un mois et demi de culture, certaines cellules se lignifient et s'entourent d'une zone génératrice produisant du bois vers l'intérieur et du liber vers l'extérieur. Il se forme aussi un certain nombre de nodules cribrovasculaires répartis très irrégulièrement.

II. GENRE *Rosa* : *Rosa wichuraiana* CRÉPIN. — Le mode de végétation de certains rosiers sarmenteux, notamment des hybrides de *Rosa wichuraiana*, présente de grandes analogies avec celui des Ronces. Ces plantes émettent chaque année des pousses longues de plusieurs mètres qui se ramifient et fleurissent l'année suivante, puis finissent par dépérir, tandis que de nouvelles tiges assurent la survie de la plante. Cette similitude nous a incité à tenter la culture *in vitro* de fragments de tiges d'une variété de Rosier hybride de *wichuraiana* nommée «American Pillar». Nous avons donc ensemencé des fragments de tiges de cette variété, âgées de quelques mois, dans un milieu nutritif contenant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5 \cdot 10^{-7}$ . Contrairement à ce que pouvait laisser supposer les essais effectués avec les *Rubus*, la croissance *in vitro* a été très faible et très irrégulière. Quelques rares fragments ont formé très lentement des cals minuscules, soit latéralement au contact du milieu, soit à l'air libre sur la surface de section des rameaux. Plusieurs ont produit des racines et ceux qui présentaient des ébauches de bourgeons ont donné naissance à des tiges feuillées qui ont atteint quelques centimètres. Nos résultats sont analogues à ceux qu'ont obtenu P. NOBÉCOURT et M<sup>me</sup> L. KOEFLER (60) avec les variétés «Hiawatha» et «Dorothy Perkins». Mais ces auteurs ont été plus heureux que nous dans leurs tentatives, car avec la variété «New Dawn» ils ont observé des proliférations vigoureuses en présence d'acide indole acétique et, en repiquant les cals ainsi formés sur des fragments de tiges, ils ont pu isoler une souche de tissus de rosier.

### C. LIANES DIVERSES.

Les espèces que nous venons d'étudier sont les seules dont les tissus se soient développés *in vitro* d'une façon notable. Nos essais ont porté sur un certain nombre d'autres lianes, mais les résultats ont été beaucoup moins satisfaisants. Dans certains cas, les tiges produisaient irrégulièrement de très petits mamelons impossible à repiquer. Dans d'autres, la croissance se manifestait uniquement par l'émission de quelques racines. Nous ne ferons que mentionner les noms de ces espèces. Ce sont : *Hedera helix* L., *Tetrastigma voinieriana* (VIALA) PIERRE., *Clematis vitalba* L., *Pueraria thunbergiana* (SIEB. et ZUCC.) BENTH. *Tecoma radicans* JUSS., *Wisteria sinensis* SWEET, *Akebia quinata* (HOUTT.) DECNE, *Bougainvillea glabra* CHOISY., *Clerodendron thomsonae* BALF. Plusieurs de ces plantes telles que *Tetrastigma voinieriana* ou *Pueraria thunbergiana*, ont cependant une vigueur exceptionnelle. Leurs tiges s'allongent en une saison de 4 ou 5 mètres. Il semble donc que, contrairement à ce que nous pensions avant d'entreprendre nos expériences, il n'y ait pas forcément une relation entre la rapidité de croissance de la plante entière et le développement de ses tissus *in vitro*. Ce résultat n'est pas vraiment surprenant car la croissance en longueur d'une tige est due à l'activité de son

méristème primaire; tandis que la croissance *in vitro* résulte de l'activité cambiale de la plante qui est le fait des méristèmes secondaires et n'est pas forcément en relation avec celle des points végétatifs.

## II. Développement de fragments de tissus ou d'organes d'arbres.

Les premières véritables cultures de tissus végétaux furent réalisées en partant du tissu cambial de différents arbres tels que le Saule, l'Aune, l'Orme, etc. Dès 1934, GAUTHERET (15) parvint à obtenir des cultures de tissus de *Salix caprea* L. et effectua diverses études anatomiques et physiologiques sur ces cultures. Mais à cette époque la technique était encore imparfaite et il lui fallut (26) plusieurs années de tâtonnement pour mettre au point les milieux de culture que nous utilisons actuellement. Ceci explique que cet auteur n'ait pu à cette époque obtenir une survie indéfinie par des repiquages successifs. Les résultats encourageants fournis par nos essais sur différentes plantes ligneuses comme les vignes et les ronces, nous ont incité à entreprendre à notre tour de cultiver des tissus d'arbres et comme notre but était d'essayer de cultiver des parasites obligatoires, nous nous sommes adressés à des espèces arborescentes facilement attaquées par des Urédinées (Aubépine et Poirier), ou par des Érysiphacées (Lilas).

I. *CRATAEGUS MONOGYNA* JACQ. — Pour obtenir des cultures de tissus d'Aubépine, nous avons procédé de deux manières différentes. Nous avons tout d'abord fait des cultures de tissus cambial provenant de grosses branches âgées de plusieurs années, suivant la méthode de GAUTHERET; puis par la suite nous sommes partis de jeunes tiges âgées de quelques mois que nous mettions en culture suivant la même technique que pour les tissus de lianes.

A. *Morphologie externe.* — a. *Croissance normale.* — Dès que l'on isole des fragments de tissu cambial d'Aubépine pour les disposer à la surface d'un milieu gélosé, on constate que leur couleur blanc-jaunâtre se modifie rapidement et qu'ils prennent en quelques minutes une teinte acajou, puis brun foncé. Cette coloration paraît causée par l'oxydation des tannoïdes pyrocatechiques que renferment les membranes cellulaires de cette espèce. Cette modification, toute superficielle, n'intéresse que les cellules lésées par les opérations de mise en culture. Elle ne provoque aucune altération de la vitalité des tissus, car, au bout de quelques jours, ceux-ci se mettent à proliférer et reprennent leur teinte blanchâtre. Toute la partie située en dehors du milieu de culture augmente peu à peu d'épaisseur et se couvre de mamelons irréguliers, particulièrement développés sur la face qui adhérerait au bois; leur croissance est très lente et ils deviennent légèrement chlorophylliens lorsqu'on les expose à la lumière. La partie de la lamelle de tissu cambial qui est située hors du milieu, s'épaissit ainsi de quelques millimètres en deux mois alors que celle qui plonge dans le substratum ne se modifie pas. Le contact du milieu paraît donc inhiber entièrement la croissance. Les massifs parenchymateux se forment aussi bien du côté foliaire des fragments que du côté radical; toutefois, ils sont plus nombreux et plus volumineux vers cette dernière extrémité; cette légère dissymétrie de développement semble indiquer une faible polarité.

Nous avons étudié de la même manière le développement de fragments de jeunes tiges, épaisses de quelques millimètres de diamètre. Pour cela nous les avons ensemencées dans un milieu ne renfermant pas d'hétéroauxine, en les enfonçant de quelques milli-

mètres dans la gélose, de manière que leurs extrémités radicales se trouvent situées à l'air libre. Nous avons alors observé que la croissance était surtout nette à cette extrémité radicale où le cal se formait sur la surface de section de l'explantat; elle n'était toutefois pas limitée à cette seule région, et de petits mammelons apparaissaient tout le long de la tige, mais uniquement en dehors du milieu; toutefois, ils demeuraient de taille réduite et nous n'avons observé de cals importants que sur l'extrémité radicale. Contrairement à ce que nous avons observé sur des fragments de tissu cambial provenant de branches âgées, l'extrémité foliaire des explantats ne proliférait jamais. La polarité des jeunes tiges paraît donc beaucoup plus accentuée que celle des organes âgés.

*b. Croissance en présence de substances de croissance.* — Lorsqu'on incorpore au milieu de l'acide *d* pantothénique sous forme de *d* pantothénate de calcium, à la concentration de  $10^{-6}$  (54), on constate que la croissance des cals est plus rapide; ceux-ci deviennent plus gros, ils peuvent atteindre 1 centimètre d'épaisseur et demeurent constamment incolores sans jamais élaborer de chlorophylle, même lorsqu'on les expose à la lumière. Toutefois, l'acide *d* pantothénique n'est pas le seul facteur de croissance capable d'influer sur le développement des tissus d'Aubépine. Nous avons en effet constaté qu'une hétéroauxine telle que l'acide naphthyle acétique était plus active encore; c'est ainsi que lorsqu'on ajoute au milieu de culture cette substance à la concentration de  $5.10^{-7}$ , on constate que les massifs parenchymateux qui se développent sur les explantats deviennent encore plus volumineux qu'en présence de pantothénate de calcium (pl. X, fig. B). Ces deux substances agissent d'ailleurs en synergie, car c'est en combinant leur action que l'on observe le meilleur développement. C'est ainsi que lorsqu'on incorpore au milieu du *d* pantothénate de calcium à la concentration de  $10^{-6}$  et de l'acide naphthyle acétique à la dose de  $5.10^{-7}$ , on observe une croissance exubérante, les cals formés en deux mois sur les explantats pouvant dépasser 2 centimètres d'épaisseur (pl. XI, fig. A).

*c. Influence de l'état de la plante sur la croissance in vitro.* — L'Aubépine entre en végétation dans la région parisienne vers la mi-avril. Ses tiges se développent alors très rapidement. Elle fleurit vers le début de mai, puis la croissance se ralentit et s'arrête vers la mi-juin. A partir de cette époque, le bourgeon terminal des tiges reste à l'état de repos jusqu'au printemps suivant. Nous avons cherché si cet arrêt de végétation influait sur la croissance de fragments de tige cultivés *in vitro*, et pour cela nous avons effectué des prélèvements depuis la fin avril jusqu'au mois d'août. Nous avons constaté que les fragments mis en culture au printemps se développaient plus rapidement que ceux que nous avons isolés au cours de l'été, tandis que les cals formés sur des explantats mis en culture après le mois de juillet devenaient moins gros et se différenciaient davantage. N'ayant pas fait de culture après la chute des feuilles, nous ignorons si des fragments prélevés en automne ou en hiver peuvent proliférer *in vitro*.

*B. Structure anatomique.* — *a. Structure de la tige normale.* — Une coupe pratiquée dans une jeune tige d'aubépine à 15 ou 20 centimètres du point végétatif montre un épiderme cutinisé très résistant qui entoure une écorce excessivement mince formée de quelques assises de cellules; une rangée de fibres péricycliques sclérifiées limite le cylindre central où l'on distingue le liber également très mince; la zone génératrice qui est continue entoure entièrement un cylindre de bois bien développé, au centre duquel se trouve la moelle formée d'un parenchyme à grandes cellules.



I. II. III. IV. J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Fragments de tige d'Aubépine cultivés pendant un mois et demi en présence de différents facteurs de croissance.

1. Fragment se développant sans substance de croissance.
2. En présence d'acide pantothénique à la concentration de  $5,10^{-7}$ .
3. En présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5,10^{-7}$ .
4. En présence d'acide pantothénique et d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5,10^{-7}$ .



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Fragments de tiges de Tabac ayant été cultivées pendant deux mois en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $10^{-7}$ .

A gauche : la tige a été plantée dans le milieu en position inversée de telle sorte que la face radicale soit à l'air libre. Un cal blanc et compact est apparu sur cette face, tandis qu'un second cal annulaire formé de tissus mous et translucides s'est développé au contact du milieu.

A droite : la tige a été plantée de telle manière que la face racinaire plonge dans le milieu. La face foliaire n'a pas proliféré, la croissance s'est limitée à un cal annulaire à la surface du milieu.



b. Structure de fragments de tige ayant proliféré *in vitro*. — Des coupes longitudinales pratiquées dans des fragments de tige cultivés pendant deux mois (fig. 8) montrent que la prolifération s'est produite à partir du cambium et du liber. Les cellules cambiales, en se divisant activement, ont élargi la tige qui est évasée vers le sommet, puis le parenchyme néoformé a complètement recouvert le bois qui demeure en place, surmonté du cal. Ce cal est d'abord formé d'un parenchyme homogène, puis peu à peu on observe quelques flots de cinq à six cellules contiguës dont les parois se sont épaissies, et couvertes d'ornementations lignifiées. Ces flots sont entourés d'une assise génératrice circulaire qui produit du bois vers l'intérieur et du liber vers l'extérieur. Il

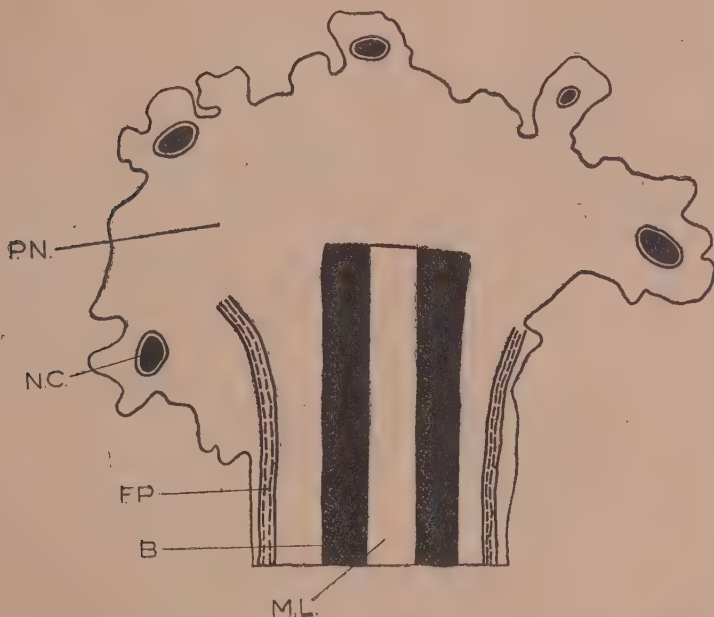


FIG. 8. — Schéma d'une coupe radicale d'un fragment de tige de *Crataegus monogyna* JACO. après deux mois de culture *in vitro* en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de 5,10-7.

Cette coupe représente le cal qui s'est formé sur l'extrémité radicale du fragment. Le tissu cambial a proliféré pour former une masse importante de parenchyme qui a débordé largement sur les tissus préexistants ; à la périphérie du cal se sont différenciés un certain nombre de nodules cribrovasculaires. B : Bois ; F P : Fibres péri-cycliques ; N C : Nodules cribrovasculaires ; P N : parenchyme néoformé.

apparaît ainsi un certain nombre de nodules cribrovasculaires disposés au hasard, mais cependant plus fréquents à la périphérie du cal (fig. 9). En outre, un grand nombre de cellules continuent à sécréter des tanins qui sont précipités sous forme de grosses granulations au moment de la fixation.

II. *PYRUS COMMUNIS* L. var. « Conférence ». — Le développement des tissus de Poirier *in vitro* est très voisin de celui des tissus d'Aubépine ; aussi nous nous contenterons de la décrire très rapidement.

A. Morphologie externe. — a. Croissance normale. — Lorsque l'on enfonce des fragments de jeune tige de Poirier dans des milieux gélifiés ne renfermant aucune subs-

tance de croissance, en les orientant de manière que leur extrémité radiculaire soit située à l'air libre, ils ne prolifèrent que très lentement pour donner à cette extrémité des cals très réduits comparables à ceux qui se forment dans les mêmes conditions sur des tiges d'Aubépine. Toutefois, même exposés à la lumière, ces cals n'élaborent jamais de chlorophylle. En outre, ils produisent fréquemment de longs pseudothalles.

b. Croissance en présence d'hétéroauxine. — En présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$  les cals deviennent beaucoup plus volumineux et peuvent atteindre un centimètre et demi de diamètre. Une substance brune produite vraisemblablement par l'oxydation des tanins libérés au moment de la mise en culture diffuse lentement dans le milieu et celui-ci se colore au voisinage de la tige.

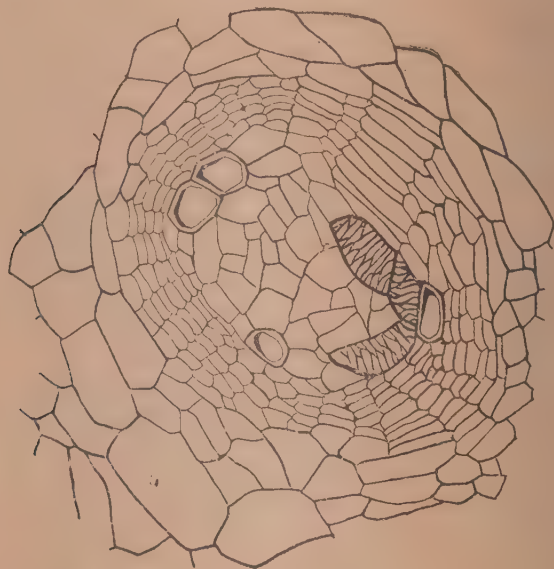


FIG. 9. — Détail d'un nodule cribrovasculaire formé à l'intérieur d'un cal de *Crataegus monogyna*.

Il est constitué par une zone génératrice cyclisée entourant un noyau de cellules ligneuses. A la périphérie de cette zone génératrice on rencontre des éléments criblés.

Ces cals, comme ceux que produit l'Aubépine, naissent à partir de la zone génératrice et du liber. Ils sont formés d'un parenchyme homogène renfermant quelques nodules cribrovasculaires.

III. *SYRINGA VULGARIS* L. var. «M<sup>m</sup>° Florent Stepman». — Différents auteurs, tels que ZIMMERMAN, VAN DER LEK et KRYTHE, au cours d'essais de bouturage, ont étudié l'action des hétéroauxines sur la tige de Lilas et ont constaté que ces tiges sont capables de produire des cals très volumineux; aussi nous a-t-il paru intéressant d'entreprendre la culture *in vitro*. N'ayant pas cultivé les tissus de Lilas sans hétéroauxine, nous ignorons s'ils peuvent se développer en l'absence de ce produit.

A. Morphologie externe. — Croissance en présence d'hétéroauxine : Lorsqu'on ensemence des fragments de jeunes tiges sur des milieux gélosés renfermant de l'acide

naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ ; en les orientant d'une manière telle que leurs extrémités radiculaires soient situées à l'air libre, ils ne tardent pas à proliférer; au bout de quelques jours, un anneau continu de parenchyme apparaît sur la face radicale des explantats à l'emplacement de la section de la zone génératrice. En

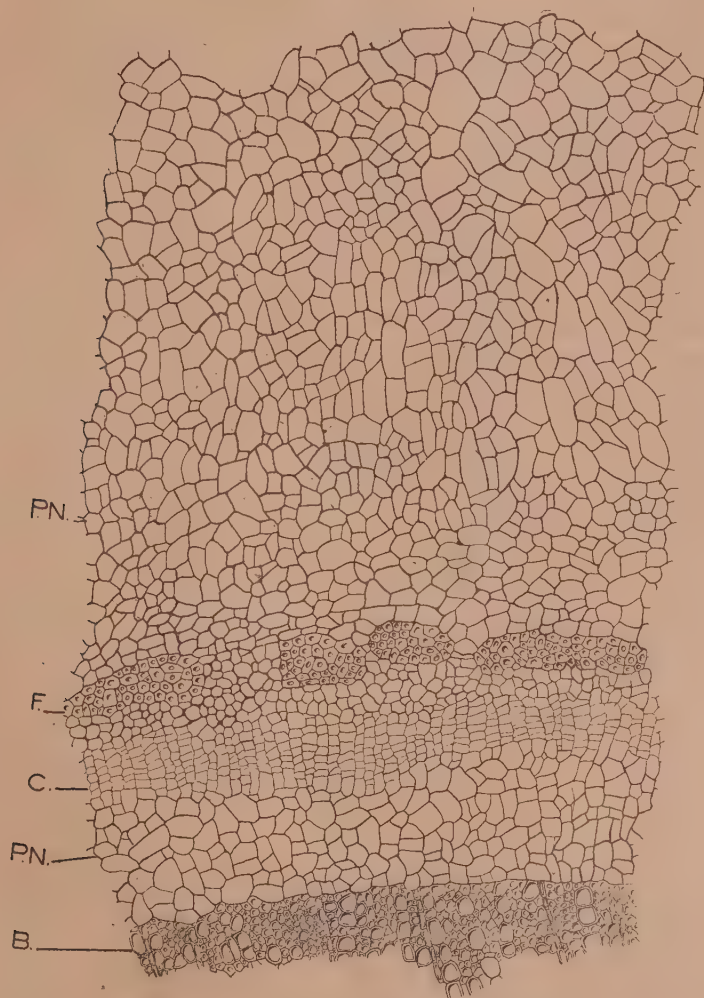


FIG. 10. — Coupe transversale pratiquée dans une tige de Lilas ayant été cultivée pendant deux mois en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ . La coupe a été faite un peu au-dessus du niveau du milieu de culture à l'endroit où la prolifération était la plus intense.

P N : Parenchyme néoformé; F : Fibres; C : Cambium; B : Bois.

Le tissu cambial a proliféré faiblement pour former une mince bande de parenchyme P N qui le sépare du bois B. Le développement du parenchyme cortical a été beaucoup plus intense; il a donné naissance à une énorme masse de tissus néoformés.

même temps, toute la partie de la tige, qui est située en dehors du milieu nutritif, augmente peu à peu d'épaisseur. Cet accroissement est très sensible au contact même

de la gélose, où se développe un second cal qui entoure rapidement le fragment et devient aussi volumineux que celui qui termine la tige et souvent finit par le rejoindre. Si bien qu'après deux mois de culture, toute la partie située à l'air est recouverte d'une énorme masse de parenchyme irrégulièrement mamelonnée. Exposés à la lumière diffuse, ces cals deviennent légèrement chlorophylliens.

Le mode de croissance que nous venons de décrire peut laisser supposer que les tissus de la tige sont peu polarisés, mais en réalité il n'en est rien, car si l'on dispose les fragments de manière telle que leur extrémité foliaire se trouve située à l'air libre, on s'aperçoit qu'elle ne prolifère pas du tout. En ce cas, la croissance est limitée à la partie médiane de l'explantat, car le développement de la face radiculaire profondément

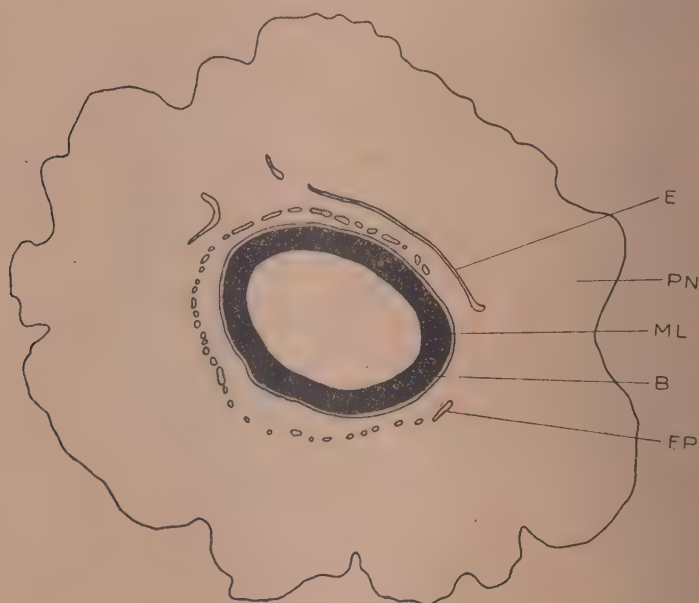


FIG. 11. — Coupe schématique d'un fragment de tige de *Syringa vulgaris* ayant été cultivé pendant deux mois en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $5.10^{-7}$ .

Le parenchyme cortical a proliféré pour former une masse volumineuse de parenchyme indifférencié. Les tissus néoformés ont au cours de leur croissance complètement entouré les fragments d'épiderme E qui n'ont pas été éliminés au cours du prélèvement.

ML : Moelle ; B : Bois ; FP : Fibres péri-cycliques ; PN : Parenchyme néoformé ; E : cellules épidermiques tuées au moment de la mise en culture.

immergée est alors imbibée par le contact du milieu. D'autre part, si l'on couche les explantats à plat sur la gélose, on constate que leurs extrémités foliaires ne prolifèrent pas, tandis que des néoformations volumineuses apparaissent vers l'extrémité radiculaire. Le développement des tiges de cette plante est donc nettement polarisé.

B. *Caractères anatomiques.* — a. *Structure de la tige normale.* — La tige du Lilas, lorsqu'elle a atteint 20 à 30 centimètres de longueur, présente la structure suivante : elle possède un épiderme qui se subérifie rapidement ; il recouvre un parenchyme

cortical épais formé de grosses cellules arrondies ; sous ce parenchyme cortical les fibres péricycliques forment des flots séparés ; en allant vers l'intérieur, on rencontre ensuite le liber composé d'un parenchyme dans lequel se différencient non seulement des tubes criblés, mais encore des fibres libériennes réunies en petits groupes ; l'assise génératrice donne naissance, vers l'intérieur, à un anneau continu de bois qui entoure la moelle.

b. Structure de la tige cultivée *in vitro*. — Une coupe transversale pratiquée après deux mois de culture dans la tige à l'endroit où la prolifération est la plus intense, c'est-à-dire au niveau du milieu de culture, présente l'aspect suivant (fig. 10 et 11) : on y reconnaît, en partant du centre, la moelle et le bois qui ne se sont pas modifiés. La zone génératrice a légèrement proliféré pour former à l'intérieur, vers le bois, un parenchyme formé de quelques assises de grandes cellules ; les régions internes du liber sont elles-mêmes peu modifiées. Par contre, les cellules des assises les plus externes de ce tissu se sont multipliées activement ; le cercle de fibres péricycliques se trouve interrompu en plusieurs endroits par suite de leur croissance ; le péricycle ainsi brisé a laissé échapper, à l'extérieur, un parenchyme qui a proliféré activement et se trouve mélangé au parenchyme cortical dont la croissance a été considérable ; ce dernier a donné naissance à des masses importantes de tissus néoformés ; ceux-ci, en se développant à l'extérieur de la tige ont formé un cal qui emprisonne maintenant les tissus les plus externes, tels que des fragments d'épiderme qui se sont peu modifiés ; ce parenchyme est formé de cellules de taille régulière ; il demeure absolument homogène. Jamais nous n'avons vu s'y former ni cellules ligneuses, ni zone génératrice.

### III. Développement de fragments d'organes de plantes herbacées.

Au moment où nous avons commencé nos recherches, on savait cultiver des tissus de plantes herbacées produisant des organes charnus, comme la racine de Carotte, de Scorsonère ou le rhizome de Topinambour, qui résultent d'une intense prolifération cambiale. Celles qui forment des tiges aériennes annuelles, s'accroissant peu en épaisseur, n'avaient guère été étudiées. On n'était jamais parvenu à cultiver les tissus normaux de la tige de ces dernières, mais uniquement des tissus tumoraux, et l'on pouvait se demander si la culture des tissus normaux d'espèces herbacées, ne manifestant qu'une activité cambiale réduite, serait possible. Nos tentatives de cultures de parasites obligatoires nous ont conduits à en étudier un certain nombre ; ce sont tout d'abord le Muflier, puis diverses Malvacées : Mauve, Guimauve, Abutilon, sur lesquelles nous avons tenté de cultiver diverses Urédinées, et enfin le Tabac, que nous avons utilisé pour maintenir *in vitro* divers virus.

I. *ANTIRRHINUM MAJUS* L. — Le Muflier est une plante vivace dont les tiges ne sont pas annuelles comme celles de la plupart des plantes herbacées de notre flore, mais persistent pendant plusieurs années. Nous avons étudié la croissance *in vitro* de fragments de tiges uniquement en présence d'hétéroauxine, et nous ignorons s'il est possible d'obtenir leur développement en l'absence de cette substance.

A. *Morphologie interne*. — a. Croissance en présence d'hétéroauxine. — Lorsqu'on ensemence des fragments de tige de Muflier dans un milieu qui contient des doses d'hétéroauxine comprises entre  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ , en les orientant de manière à ce que leurs extré-

mités radiculaires se trouvent en dehors du milieu, la croissance se manifeste au bout de quelques jours par la formation de racines. Ces organes sont surtout abondants vers l'extrémité radicale du fragment, puis, au bout d'une dizaine de jours, on observe un mince anneau de parenchyme légèrement chlorophyllien qui apparaît sur la face radiculaires à l'emplacement de la zone génératrice. Le cal se développe peu à peu très lentement et, après deux mois de culture, il a la forme d'un mince disque aplati qui coiffe le fragment.

Les cals apparaissent toujours en dehors du milieu de culture et uniquement sur la face radiculaires de l'explantat, si bien que lorsque l'on plante des tiges dans la gélose, de manière à ce que cette face soit immergée, elle ne prolifère pas et l'explantat produit uniquement des racines; les tissus de la tige d'*Antirrhinum* possèdent donc une polarité très marquée.

*b. Influence de l'état de la plante sur la croissance in vitro.* — Dans les régions méridionales, le Muflier ne présente pas d'arrêt de croissance hivernal. De même sous nos climats, lorsqu'on le rentre en serre, il continue à végéter tout l'hiver. Nous avons effectué des prélèvements de fragments de tige de Muflier à diverses époques de l'année, sans remarquer d'influence saisonnière; cependant, seuls les fragments de tige jeune se développent bien; ceux qui proviennent de tige portant des boutons floraux ou des fleurs épanouies ne produisent que des cals très réduits et de très nombreuses racines.

*B. Caractères anatomiques — a. Structure de la tige normale.* — Les tiges de Muflier sont recouvertes d'un épiderme assez résistant, se détachant très facilement; l'écorce, très mince, est constituée par quelques assises de cellules; le liber est également mince; la zone génératrice produit, vers l'intérieur, un parenchyme vasculaire dans lequel on rencontre de nombreux vaisseaux, entourant la moelle, qui, elle, est très développée et occupe tout le centre de la tige.

*b. Structure de fragments de tige ayant proliféré in vitro.* — Lorsqu'on étudie, sur des coupes longitudinales, le développement de ces fragments de tige après deux mois de culture, on constate que la zone génératrice a proliféré uniquement à l'extrémité radiculaires de l'explantat, pour former un bourrelet parenchymateux qui a formé le cal, en débordant de chaque côté vers l'intérieur et l'extérieur de la tige. Les assises les plus externes du parenchyme médullaire ont également contribué à la formation de ce cal; leur activité est bien visible aux endroits où la zone génératrice a été arrachée ou détruite, au moment de la mise en culture; à cet endroit, les tissus nés de leur prolifération font irruption à l'extérieur. Ce cal ne demeure pas homogène, mais il se différencie pour donner un grand nombre de modules cribrovasculaires typiques, semblables à ceux que nous avons décrits chez certaines plantes ligneuses comme l'Aubépine; toutefois, ces nodules sont beaucoup plus nombreux que ceux que l'on rencontre dans les cultures de tissus d'arbres.

*II. MALVACÉES.* — La culture de tissus de tige de Malvacées présente des difficultés importantes, et ce n'est qu'après de nombreux essais infructueux que nous avons pu obtenir des résultats satisfaisants. Nos essais ont porté surtout sur trois espèces: la grande Mauve, *Malva sylvestris* L.; la Guimauve, *Althea officinalis* L.; la Guimauve de Thuringe, *Althea thuringiaca* L., originaire d'Europe centrale.

*1. Malva sylvestris* L. — La Mauve est ordinairement bisannuelle; la première

année, elle ne fleurit pas mais forme une rosette de feuilles et enfonce profondément dans le sol une racine pivotante; sa tige se développe seulement l'année suivante et la plante meurt souvent après la floraison. Nous avons étudié le développement de fragments de racines et de tiges de cette espèce en présence d'hétéroauxine, mais nous ignorons le comportement des tissus de cette plante sur des milieux ne renfermant pas de substance de croissance.

A. *Morphologie externe.* — a. Croissance en présence d'hétéroauxine. — Racine : Lorsqu'on ensemence des fragments de racine de Mauve dans des milieux renfermant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ , ils se développent très peu; ils produisent simplement, au contact du milieu de culture, des pustules formées d'un tissu fragile d'aspect farineux ou de masses translucides de tissus mous et dissociés impossibles à repiquer.

Tige : En présence de doses moyennes d'acide naphthyle acétique ( $5.10^{-7}$ ), la croissance de fragments de tige débute d'une façon très active quelques jours après l'ensemencement. Toute la partie supérieure des explantats se couvre d'une mince couche de cellules blanches et luisantes; la prolifération est particulièrement active sur la surface de section de la tige qui, en un mois et demi, se couronne de volumineux cals de parenchyme entièrement incolore, en même temps, on voit apparaître groupés à la périphérie du cal des faisceaux de racines qui s'enfoncent rapidement dans la gélose.

Les cals ne se forment que du côté radiculaire de l'explantat et, comme ceux du Muflier, ne se développent pas à l'intérieur du milieu nutritif. Lorsqu'on enfonce dans ce dernier l'extrémité radiculaire des fragments, la prolifération est limitée à une production de racines. Les tiges de Mauve présentent donc une polarité très marquée.

b. Influence de l'état de la plante sur la croissance *in vitro*. — L'âge des tiges utilisées pour le prélèvement a une grande importance sur l'évolution des cultures. Au cours de la première année de la végétation de la plante, elles sont trop courtes pour être utilisables et ce n'est qu'au printemps suivant qu'il est possible d'effectuer des prélèvements; il convient de le faire au cours des deux mois qui suivent le début de la pousse, c'est-à-dire avant que n'apparaissent les boutons floraux; si l'on attend plus tard, les fragments mis en culture sont incapables de former des cals et ne produisent que des racines. De même que chez la Vigne, les régions les plus jeunes de la tige, dans lesquelles il n'existe pas d'assise génératrice individualisée, paraissent également incapables de se développer *in vitro* et; lorsqu'on les ensemence, elles demeurent vivantes fort longtemps sans se modifier.

B. *Caractères anatomiques.* — a. Structure de la tige normale. — Lorsqu'on examine des coupes pratiquées à une vingtaine de centimètres de l'extrémité de la tige de Mauve un peu avant la floraison, on constate qu'elle est limitée extérieurement par un épiderme épais qui recouvre un parenchyme cortical très mince. Le cylindre central est délimité par de petits flots de fibres celluloseuses très rapprochés les uns des autres. Il se compose de deux anneaux concentriques très minces de liber et de bois secondaires séparés par une zone génératrice liberoligneuse. Le bois est formé de quelques grands vaisseaux associés à des éléments plus petits, fibres et cellules ligneuses en fibres radiales. Il entoure entièrement la moelle formée d'un parenchyme à grandes cellules régulières.

b. Structure de fragment de tige cultivée *in vitro*. — Lorsqu'on suit sur des coupes longi-

tudinales la croissance *in vitro* de la tige de Mauve, on peut voir qu'elle n'est pas limitée au cambium, mais que le liber et le parenchyme médullaire participent également à l'élaboration des cals; comme pour les autres espèces, ceux-ci sont tout d'abord formés de parenchyme homogène, mais, au bout d'un certain temps, il apparaît dans ce parenchyme une zone génératrice (fig. 12 et 13) qui est raccordée à la zone génératrice normale de la tige et la prolonge dans le cal au-dessus du bois et de la moelle; cette assise génératrice très régulière donne naissance, vers l'intérieur, à un parenchyme vasculaire renfermant de très nombreux vaisseaux orientés comme dans la tige

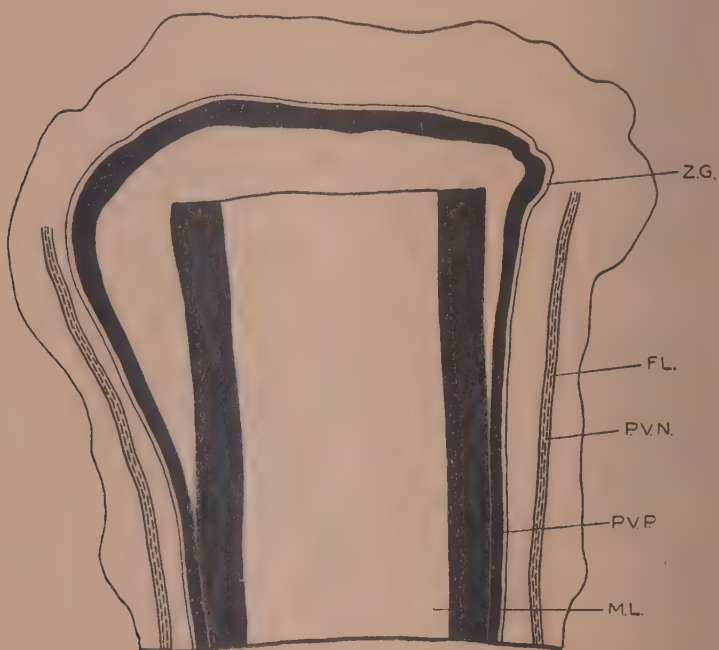


FIG. 12. — Coupe schématique d'un fragment de tige de *Malva sylvestris* ayant été cultivé pendant deux mois en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $5.10^{-7}$ .

Cette coupe représente la face radicale de la tige. On remarque que le tissu cambial a proliféré pour former un cal qui recouvre les tissus préexistants. À l'intérieur de ce cal est apparu une zone génératrice Z G qui se raccorde à la zone génératrice préexistante et forme du liber vers l'extérieur et des vaisseaux vers l'intérieur du cal.

P V N : Parenchyme vasculaire néoformé; P V P : Parenchyme vasculaire préexistant; M L : Moelle; Z G : Zone génératrice; F L : Fibres libériennes.

normale, et vers l'extérieur, à du liber dans lequel on observe de grandes cellules à mucilage; cette zone génératrice continue rappelle celle que l'on observe dans les cals de Vigne; elle est toutefois beaucoup plus régulière et donne naissance à un tissu plus différencié.

2. *Althea thuringiaca* L. — Les tiges de l'*Althea thuringiaca* L. cultivées *in vitro* se développent d'une manière en tous points comparable à celles de *Malva sylvestris*; aussi nous ne nous y arrêtons pas plus longtemps. Celles d'*Althea officinalis* L., par contre,

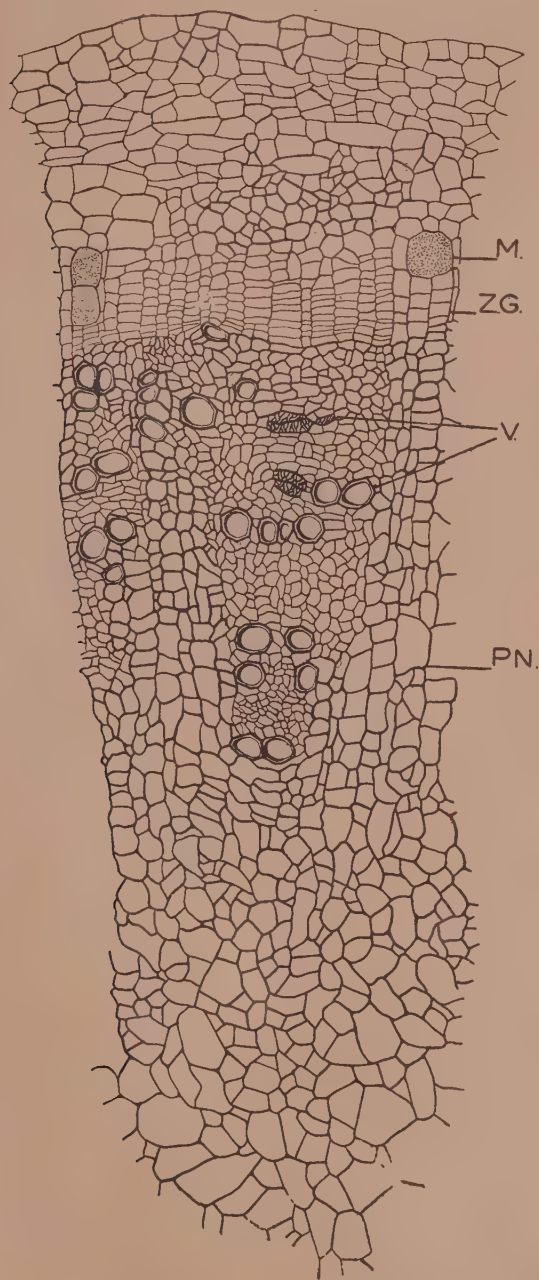


FIG. 13. — Coupe longitudinale d'un cal produit par une tige de Mauve après deux mois de culture en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ .

Une zone génératrice libéroligneuse est apparue dans ce cal et a produit vers l'intérieur un parenchyme vasculaire où l'on distingue des vaisseaux V et vers l'extérieur un parenchyme libérien où se sont différenciées de grandes cellules à mucilage M. Cette structure reproduit celle d'une tige.

P N : Parenchyme néoformé ; M : Cellules à mucilage ; Z G : Zone génératrice ; V : Vaisseaux.

prolifèrent avec une extrême lenteur. Les cals qui apparaissent ici également du côté radical des fragments, à l'emplacement de la zone génératrice, ne s'accroissent pas suffisamment pour que leurs bords intérieurs puissent se souder et conservent donc une forme annulaire; ils sont entièrement lisses et fortement chlorophylliens. La structure anatomique de ces bourrelets rappelle celle des cals de *Malva sylvestris*; cependant ils sont encore plus lignifiés, au point que l'on a de la peine de les couper avec un scalpel.

III. *NICOTIANA TABACUM* L. var. «White Burley». — Le Tabac est susceptible d'héberger, en dehors du virus bien connu de la Mosaïque, un certain nombre d'autres virus communs à diverses Solanées, et en particulier le Virus X et le Virus Y de la Pomme de terre qui provoquent chez cette plante des mosaïques parfois accompagnées de nécroses. C'est dans le but de cultiver *in vitro* ces divers virus que nous avons effectué des cultures de tissus de Tabac.

A. *Morphologie externe*. — a. Croissance normale. — Lorsqu'on ensemente des fragments de tige de Tabac dans des milieux ne renfermant pas d'hétéroauxine, en les orientant de manière que leur extrémité radiculaire soit située à l'air libre, le cal se forme très lentement sur cette extrémité, uniquement en dehors du milieu de culture; il a l'aspect d'un disque irrégulier devenant vert pâle si les cultures sont exposées à la lumière. La tige émet également un certain nombre de racines, et, assez rarement, quelques bourgeons apparaissent sur les néoformations.

b. Croissance en présence d'hétéroauxine. — Lorsqu'on incorpore au milieu de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $10^{-7}$ , les cals deviennent plus volumineux. Ils élaborent moins de chlorophylle et produisent davantage de racines; en même temps, la tige se met à proliférer au contact du milieu à la surface de celui-ci et s'entoure d'une couronne de tissu mou et translucide d'aspect bien différent du cal normal (pl. XI, fig. B).

Enfin, en présence de doses plus fortes d'hétéroauxine, on constate que, pour des concentrations comprises entre  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ , les cals deviennent encore plus volumineux, mais que leur aspect se modifie rapidement. Au bout d'un certain temps, quelques mamelons se décolorent, deviennent translucides et cette transformation gagne peu à peu une partie importante des tissus néoformés. L'examen microscopique de ces tissus translucides montre qu'ils sont, en grande partie, formés de cellules géantes ayant subi un accroissement isodiamétrique et sans cohésion entre elles.

Le Tabac est donc une plante qui paraît très sensible à l'action toxique de l'hétéroauxine, puisque des altérations se produisent pour des concentrations dix fois plus faibles ( $10^{-7}$ ) que dans le cas des autres espèces que nous avons étudiées.

Si, au lieu d'enfoncer l'extrémité foliaire des fragments dans le milieu, de manière que la face radiculaire soit située à l'air libre, on plonge cette dernière dans la gélose, son développement est en grande partie inhibé par le contact du milieu; elle ne prolifère alors qu'en présence d'hétéroauxine et dans ce cas elle fournit des néoformations toujours translucides et sans consistance localisées surtout au voisinage de la surface de la gélose. Par contre, l'extrémité foliaire, qui est située à l'air, ne prolifère pas davantage que lorsqu'elle est immergée dans la gélose. Les tiges de Tabac, comme celles de toutes les plantes herbacées que nous avons étudiées, présentent donc une polarité très nette.

c. Influence de l'état de la plante sur la croissance *in vitro*. — Le Tabac est une plante

dont la tige meurt après avoir fructifié. C'est en isolant des fragments de tiges encore jeunes en voie de croissance active que l'on obtient les meilleurs développements *in vitro*. Cependant des tiges plus âgées prélevées au moment de la floraison de la plante sont encore susceptibles de se développer pour former des cals importants.

B. *Caractères anatomiques.* — a. Structure de la tige normale. — Des coupes transver-

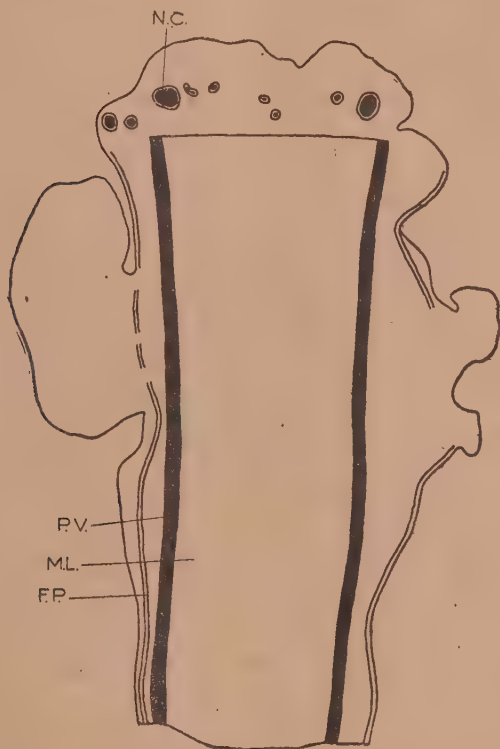


FIG. 14. — Coupe schématique d'un fragment de tige de Tabac ayant été cultivé pendant deux mois en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $10^{-7}$ .

La prolifération du cambium a donné naissance à deux cals différents. Le premier formé d'un parenchyme compact s'est développé sur la face radicale du fragment. Un certain nombre de nodules cribro-vasculaires sont apparus à l'intérieur de ce parenchyme. Le second cal constitué par un tissu mou formé de cellules géantes, s'est développé à la surface du milieu de culture. Il entoure entièrement le fragment au niveau où il émergeait de la gélose.

N C : Nodules cribrovasculaires ; M l : Moelle ; P V : Parenchyme vasculaire ; F P : Fibres péricycliques.

sales effectuées dans une tige de Tabac, une vingtaine de centimètres en dessous du point végétatif, permettent d'en examiner la structure ; on distingue à l'extérieur l'épiderme mince et poilu, puis quelques assises de parenchyme cortical qui est chlorophyllien et dont certaines cellules renferment des macles d'oxalate de calcium. Le péri-cycle formé d'une seule assise de cellules limite le cylindre central. Le liber forme un anneau continu dans lequel on distingue des flots de fibres libériennes. Cet anneau de liber est doublé intérieurement par un mince anneau de bois formé de grands vaisseaux

associés à des fibres et interrompu par des rayons médullaires. Enfin, la moelle constituée par un parenchyme à grandes cellules présente à sa périphérie, en regard des vaisseaux de première formation, des amas cellulaires colorés en rose vif par le carmin, qui sont formés par du liber interne.

b. Structure de la tige cultivée *in vitro*. — La coupe longitudinale d'un fragment de tige observée après deux mois de culture permet de voir (fig. 14) que tous les tissus, à l'exception du parenchyme vasculaire trop différencié pour proliférer, c'est-à-dire l'écorce, le parenchyme libérien, le cambium et la moelle, ont participé à la formation des cals; mais c'est surtout la croissance du parenchyme libérien qui est active. Les

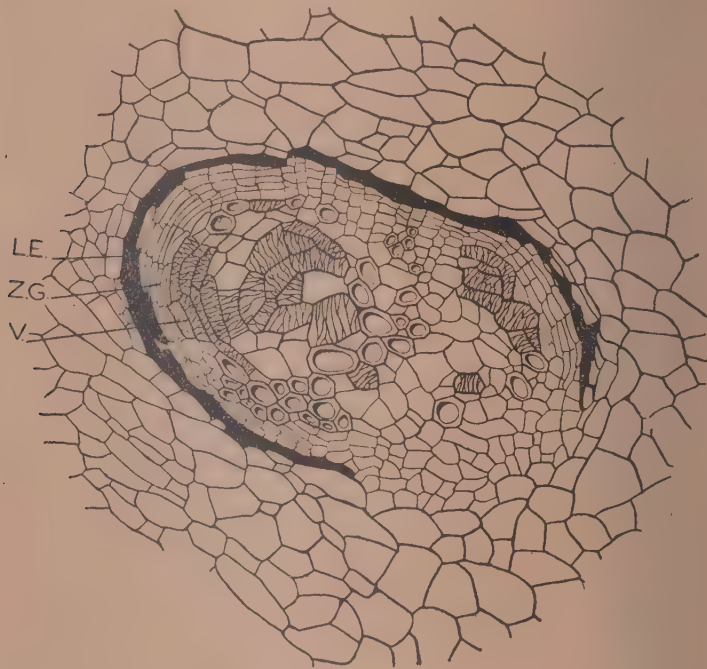


FIG. 15. — Nodule cribrovasculaire formé à l'intérieur d'un cal de *Nicotiana Tabacum* après deux mois de culture.

Ce nodule est constitué par une zone génératrice circulaire produisant du liber vers l'extérieur et du parenchyme vasculaire vers l'intérieur.

V : Vaisseaux; ZG : zone génératrice; LE : Liber nécrosé.

néoformations qui apparaissent latéralement au contact du milieu, au contraire, prennent naissance uniquement à partir du parenchyme cortical.

Ces néoformations demeurent indifférenciées pendant un certain temps, puis, peu à peu, certaines de leurs cellules groupées en petits massifs isolés épaississent leurs parois et se couvrent d'ornementations lignifiées; ces massifs s'entourent d'une zone génératrice libéroligneuse, si bien qu'après deux mois le parenchyme renferme un grand nombre de nodules cribrovasculaires analogues à ceux que nous avons décrits chez les autres plantes herbacées (fig. 15).

*Conclusions.* — Ces expériences montrent que les tissus des plantes herbacées qui

produisent uniquement des tiges annuelles de peu d'épaisseur sont susceptibles de se développer *in vitro* d'une manière comparable à celle des espèces qui produisent des organes charnus.

## C. CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES TISSUS REPIQUÉS.

Les néoformations qui apparaissent sur des fragments d'organes cultivés *in vitro* sont bien différents des tissus primitifs; c'est ainsi que leur aspect morphologique et leurs caractères anatomiques sont profondément modifiés. Alors que les fragments primitifs ont une structure régulière, ces néoformations ont généralement une structure anarchique; elles sont constituées par des parenchymes beaucoup moins différenciés, parfois même entièrement homogènes. Alors que les différents tissus d'une tige présentent fréquemment une polarité très marquée, cette propriété disparaît complètement dans les tissus néoformés. De même les tissus néoformés ont des propriétés physiologiques différentes de celles des tissus préexistants. En effet, tandis que des fragments d'organes sont souvent capables de proliférer d'une façon appréciable au contact de solutions minérales simplement glucosées, il est au contraire tout à fait exceptionnel que des milieux aussi simples puissent assurer la survie indéfinie des néoformations ainsi apparues. Dans la plupart des cas, la croissance des fragments d'organe est une croissance résiduelle qui se manifeste sous l'influence des réserves en auxines des explantats. Celles-ci sont épuisées lorsqu'après deux mois de culture il devient nécessaire de procéder au repiquage des tissus. Ces derniers ne peuvent alors poursuivre normalement leur croissance qu'au contact d'une solution renfermant une hétéroauxine. Les hétéroauxines ont donc une valeur nutritive considérable puisqu'il est généralement impossible d'obtenir une croissance durable des cultures en leur absence. Leur action ne se borne d'ailleurs pas à exalter la prolifération des tissus, car au bout d'un certain temps elles modifient profondément les caractères de leur développement. C'est pourquoi nous envisagerons l'étude de l'action physiologique des hétéroauxines en même temps que l'examen du repiquage. Nous décrirons successivement les caractères des repiquages des tissus de lianes, d'arbres et de plantes herbacées, et pour chacun de ces types de tissus nous étudierons les caractères physiologiques et anatomiques des colonies.

### A. Tissus de Lianes.

1. *VITIS VINIFERA* L. — Il est assez délicat de repiquer les cals qui se forment sur des fragments de tige de Vigne. Contrairement à ce qui se produit avec de nombreuses espèces comme la Carotte ou la Vigne-vierge, les surfaces lésées par le scalpel prolifèrent très mal. La croissance y est toujours limitée en quelques points où se forment d'abord de petits mamelons qui s'accroissent par la suite en débordant sur le reste de la partie blessée. Très souvent, au cours du repiquage suivant, on retrouve intactes ces plages touchées par le scalpel. Il importe donc de les réduire au minimum. L'étude des tissus repiqués nous a permis d'obtenir trois types de colonies tissulaires : tissus normaux, tissus sensibilisés et tissus accoutumés à l'hétéroauxine. Nous allons définir ces trois types de cal, examiner leur origine et décrire leurs caractères morphologiques, physiologiques, et anatomiques.

a. *Tissus normaux*. — En étudiant le développement de fragment d'organes, nous

avons défini la croissance normale comme étant celle qui se produit en l'absence de substances de croissance. Nous avons vu que lorsqu'on ensemence des fragments de tige de Vigne sur des milieux qui ne renferment pas d'hétéroauxine, ils se développaient pour former des masses de parenchyme constituant ce que nous appellerons le cal normal. Lorsqu'on sépare ces néoformations du fragment sur lequel ils se sont développés pour tenter ensuite de les repiquer sur des milieux dépourvus d'hétéroauxine, on constate que leur croissance cesse. Ils demeurent vivants plusieurs mois sans se modifier. Il est donc impossible d'en isoler une souche.

b. *Tissus sensibilisés*. — 1. Caractères morphologiques et physiologiques. — Lorsqu'on repique des fragments de cals normaux sur des milieux contenant de l'acide naphthyle acétique, on observe par contre des phénomènes très différents; aussi avons-nous étudié de façon très précise l'action de ce produit sur la croissance de ces tissus. Pour cela, après avoir pesé des fragments de cal d'une centaine de milligrammes qui s'étaient développés sur des tiges cultivées pendant deux mois sans hétéroauxine, nous les avons placés sur des milieux renfermant différentes doses d'acide naphthyle acétique. Des solutions nutritives dépourvues d'hétéroauxine nous ont permis d'obtenir des cultures témoins.

Une nouvelle pesée faite après deux mois de culture nous permettait d'apprécier la croissance. Nous avons ainsi constaté que, jusqu'à la concentration de  $10^{-7}$ , l'hétéroauxine ne paraît exercer aucune action. Les fragments demeurent vivants sans s'accroître sensiblement. Puis, à partir de  $10^{-7}$ , l'effet excitoformateur de l'acide naphthyle acétique commence à se manifester. Il est maximum pour  $10^{-6}$ , concentration à laquelle ce produit provoque une croissance exubérante des cultures qui s'accroissent en moyenne de 2 grammes en deux mois. Des doses plus fortes deviennent rapidement toxiques; elles provoquent la formation de cellules géantes et désorganisent les tissus. C'est donc la concentration de  $10^{-6}$  qui paraît le mieux convenir aux repiquages de Vigne. Or, si après deux ou trois passages à cette concentration, on replace les tissus sur une gamme de milieux analogues à la précédente, c'est-à-dire composée de solutions renfermant différentes doses d'acide naphthyle acétique ainsi que de témoins sans hétéroauxine, on observe des résultats très différents.

On constate tout d'abord que les tissus sont devenus capables de se développer sans hétéroauxine. Cette croissance est assez lente puisque l'augmentation de poids est d'environ 250 milligrammes en deux mois, c'est-à-dire dix fois plus faible que celle qu'on observe à la concentration optimum. Mais ce n'est pas une croissance résiduelle comme celle des fragments de tige, car elle se maintient indéfiniment. Nous entretenons de telles cultures depuis cinq ans sans hétéroauxine; elles ont déjà subi 32 repiquages. On constate ensuite (fig. 16) que le maximum de la courbe s'est déplacé vers les faibles concentrations et se trouve maintenant vers  $2,5 \cdot 10^{-7}$ . Les tissus sont devenus cinq fois plus sensibles à l'hétéroauxine, puisque ce produit exerce déjà une action inhibitrice à la concentration de  $5 \cdot 10^{-7}$ . Ce fait, assez surprenant, rappelle le phénomène de sensibilisation des tissus de Topinambour observé par GAUTHIERET. Cet auteur a en effet constaté que si l'on soumet des tissus de Topinambour pendant deux mois à des doses d'acide indole acétique supérieures à  $10^{-7}$ , ils subissent des modifications profondes et que leur prolifération est inhibée par des doses d'hétéroauxine qui, avant ce traitement, provoquaient un développement intense. Toutefois, dans le cas de la Vigne, on a affaire à un phénomène de nature différente, car, tandis que les tissus de Topinambour ainsi modifiés cessent de se développer et ne tardent pas à mourir, ceux de Vigne, au contraire,

acquièrent la propriété de proliférer indéfiniment en l'absence de substance active. De plus, cette transformation paraît définitive et irréversible. Pour le vérifier, nous avons replacé des tissus de Vigne sensibilisés et cultivés *in vitro* pendant quatre ans dans un milieu dépourvu d'hétéroauxine sur une série de milieux à concentration croissante en acide naphthyle acétique. Nous avons constaté alors qu'ils n'avaient rien perdu de leur sensibilité acquise quatre ans auparavant. Morphologiquement, les tissus sensibilisés sont absolument semblables aux tissus normaux. Les uns et les autres forment des masses compactes de parenchyme blanc ou légèrement teinté de rose, recouverts en surface d'une multitude de petits mamelons isolés (pl. XIII, fig. A). Nous

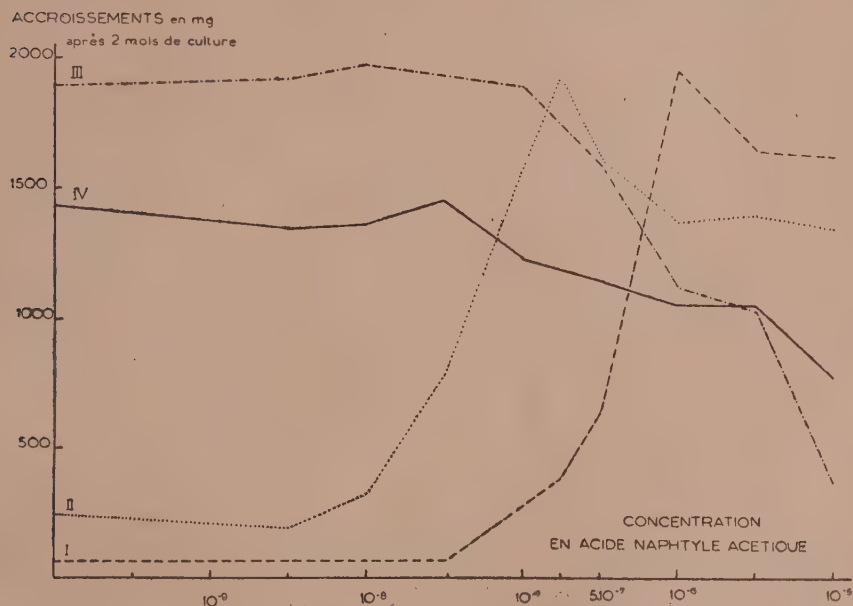


FIG. 16. — Action de l'acide naphthyle acétique sur le développement de diverses souches de tissus de Vigne.

La courbe I en tirets correspond à des tissus normaux n'ayant jamais subi l'action d'hétéroauxine. On remarque que l'acide naphthyle acétique exalte considérablement la prolifération de ce type de tissus. En l'absence d'hétéroauxine, la croissance est très faible et il serait d'ailleurs impossible de repiquer les cultures, car elles se nécroseraient en trois à quatre mois sans proliférer. La courbe II en points correspond à des tissus ayant été cultivés pendant quelque temps sur un milieu renfermant de l'hétéroauxine et ayant subi une première modification de leurs propriétés. Cultivés sans hétéroauxine, ces tissus prolifèrent lentement, mais d'une manière durable. En outre, ils présentent une sensibilité accrue à l'égard de l'acide naphthyle acétique. La courbe III en points et tirets correspond à des tissus qui, à la suite d'une culture prolongée en présence d'hétéroauxine, ont subi le phénomène d'accoutumance. On voit qu'ils sont capables de s'accroître très activement sans hétéroauxine et qu'ils sont, en outre, insensibles à l'action excito-formatrice de cette substance. Enfin la courbe IV en trait continu correspond à des tissus de crown-gall n'ayant jamais subi l'action de l'hétéroauxine. Ils sont aussi insensibles à l'action de ce produit et capables de proliférer activement en son absence.

allons voir maintenant que leur structure anatomique ne permet pas non plus de les distinguer.

2. Structure anatomique. — Lorsque nous avons considéré la structure des cals

produits par des fragments de tige de Vigne, nous avons constaté la présence de zones génératrices à disposition inversée, c'est-à-dire produisant du bois vers l'extérieur et du liber vers l'intérieur, on aurait pu croire que cette structure anormale était induite par la présence des tissus préexistants et qu'elle cessait de se produire dans les colonies repiquées; en réalité, il n'en a rien été et nous avons retrouvé des structures analogues dans les tissus repiqués. Si on isole par exemple un fragment entièrement parenchymateux et si on l'examine après deux mois de culture, on constate qu'au cours de son développement la surface sectionnée a très peu proliféré, et qu'en regard de cette surface de section le fragment a produit, comme l'explantat primitif, une zone génératrice inversée capable de fournir du bois vers l'extérieur et du liber vers l'intérieur (pl. XII).

c. *Tissus accoutumés*. — 1. Caractères morphologiques et physiologiques. — Au cours de passages sur des concentrations assez élevées en hétéroauxine, comprises entre  $5.10^{-7}$  et  $10^{-6}$ , il apparaît parfois un nouveau type de tissus, que son aspect extérieur permet de déceler immédiatement; cette apparition se présente comme il suit: sur une colonie normale opaque, légèrement chlorophyllienne ou teintée en rose par de l'anthocyane on voit se former, en un point très limité, un cal qui présente l'aspect d'une masse translucide et incolore. Cette transformation apparaît d'une manière sporadique et dans des conditions que nous n'avons pas pu préciser, comme s'il s'agissait d'une mutation; en séparant ce cal spécial et en le repiquant, on peut isoler une nouvelle souche de tissus qui conserve cet aspect anormal (pl. XIII, fig. B) et qui prolifère très intensément. Nous avons étudié l'action de l'acide naphthyle acétique sur ces tissus modifiés en les repiquant, comme les précédents, sur des milieux à concentration variant de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  ainsi que sur des témoins sans hétéroauxine. Nous avons alors remarqué qu'ils avaient perdu toute sensibilité vis-à-vis des actions excitoformatrices de ce produit qui, en outre, devenait toxique dès la dose de 0,1 mg. par litre ( $10^{-7}$ ). En l'absence d'hétéroauxine, l'accroissement moyen d'une culture de ce type est, en deux mois, d'environ 2 grammes, soit dix fois plus que celles des souches précédentes. Par contre, en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration optimum pour les tissus normaux ou sensibilisés, la croissance de ces trois catégories de tissus est comparable. Ce phénomène nouveau semble identique à celui que GAUTHERET a observé avec la Carotte et le Scorsonère et qu'il a décrit sous le nom d'accoutumance à l'hétéroauxine. Les tissus de ces plantes soumises à l'action de fortes doses d'hétéroauxine se modifient eux aussi d'une manière profonde et deviennent capables de proliférer en l'absence de substances de division avec la même intensité que des tissus normaux cultivés en présence d'acide indole acétique.

2. Structure anatomique. — Les tissus de Vigne ayant subi le phénomène d'accoutumance à l'hétéroauxine présentent une structure très particulière. Ils sont formés d'un parenchyme entièrement homogène composé de grandes cellules toutes identiques et ne renferment jamais de formations cribrovasculaires (pl. XIV, fig. A). Ils sont donc formés d'un parenchyme à l'état pur.

En repiquant constamment pendant plusieurs années ces tissus accoutumés en présence de faibles doses d'acide naphthyle acétique, de l'ordre de  $5.10^{-8}$ , nous avons constaté un phénomène assez curieux. Leurs cellules manifestaient une tendance de plus en plus grande à se séparer les unes des autres. Elles conservaient les mêmes dimensions que celles du tissu normal, mais au lieu d'être polyédriques (fig. 17), elles



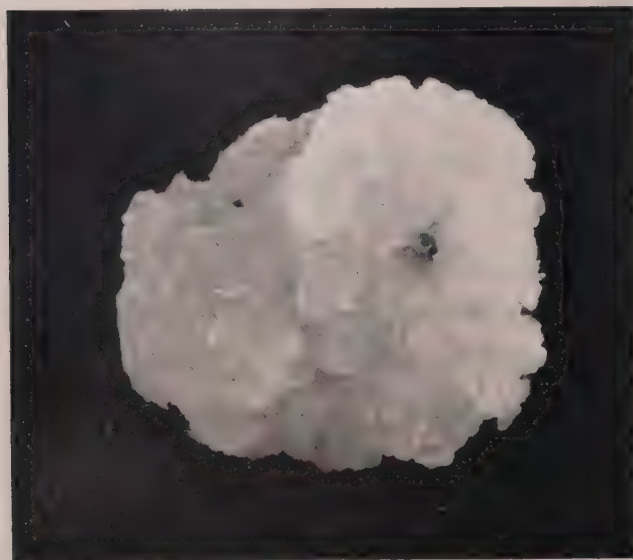
Coupe d'une culture de tissu normal de Vigne.

Remarquer qu'il est apparu, à la partie supérieure, une longue zone génératrice libéroligneuse produisant des vaisseaux vers l'extérieur du cal et du liber vers l'intérieur.



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Culture de tissus de Vigne âgée de deux mois provenant d'une souche âgée de dix-huit mois (neuvième repiquage). La colonie est blanche et opaque, composée d' nombreux mamelons serrés les uns contre les autres.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Culture de tissus de Vigne âgée de deux mois ayant subi le phénomène d'accoutumance à l'hétéroauxine.

La colonie présente l'aspect d'une masse translucide peu mamelonnée.

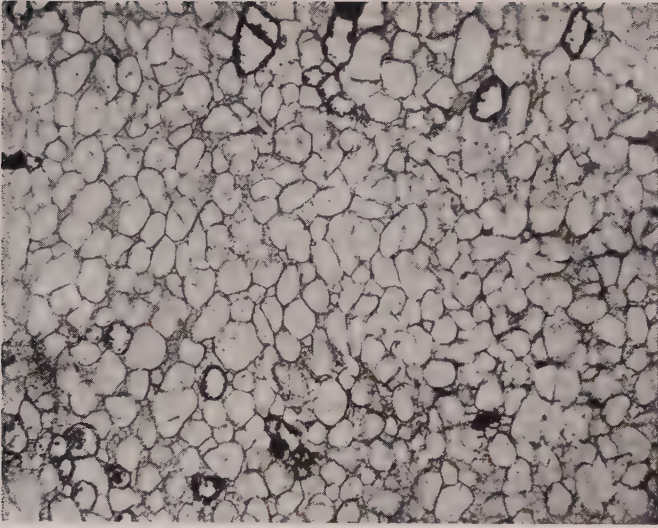
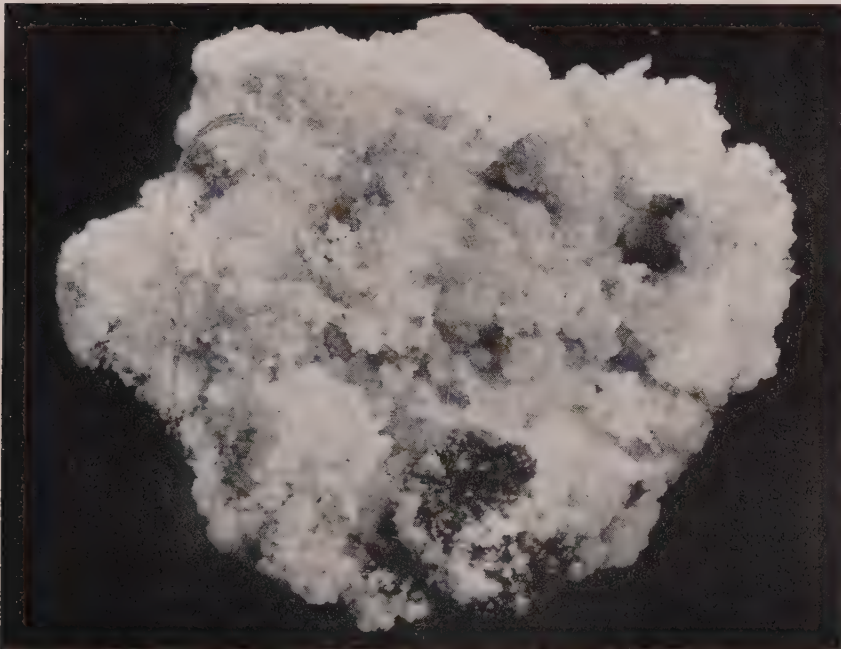


FIG. A. — Coupe d'une culture de Vigne ayant subi le phénomène d'accoutumance. Remarquer qu'elle est composée d'un parenchyme homogène, sans éléments cribrovasculaires. Certaines cellules ont élaboré des tanins qui se sont colorés en noir par le bleu de méthylène.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Colonie géante de tissus de *Parthenocissus tricuspidata* âgée de six mois.

Elle forme une énorme masse arrondie irrégulièrement mamelonnée.



perdaient leur contour anguleux et s'arrondissaient. Le tissu n'avait plus aucune cohésion et il suffisait de l'agiter avec un peu d'eau pour que ses cellules se séparent entièrement les unes des autres. Les tissus prenaient ainsi la consistance d'une purée, mais demeuraient cependant bien vivants. Nous avons en effet constaté qu'il était possible de les repiquer en prélevant un fragment à l'aide d'un scalpel avec beaucoup de précautions pour ne pas dissocier les cellules en le transportant sur un milieu neuf. Le fragment ne tardait pas à proliférer activement. Nous avons ainsi pu isoler une souche qui conserve ce caractère.

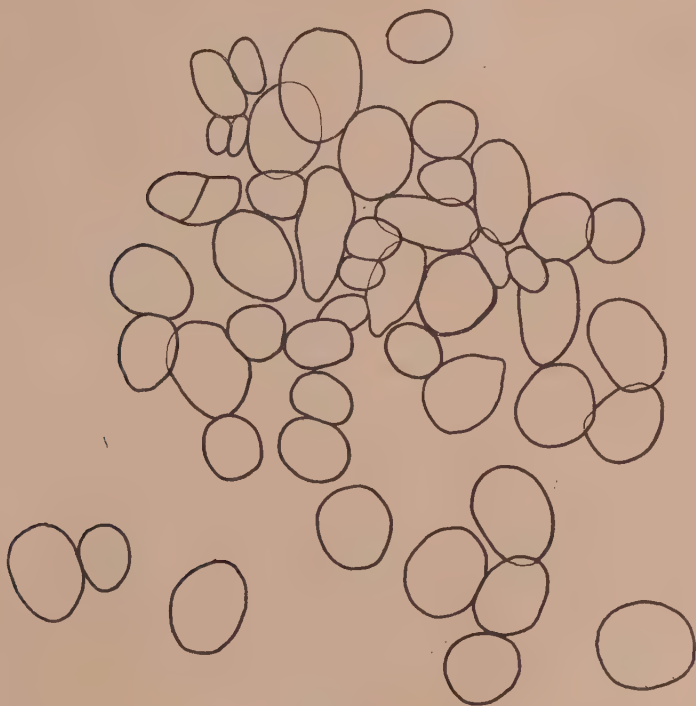


FIG. 17. — Cellules de culture de tissus de Vigne ayant manifesté le phénomène d'accoutumance à l'hétéroauxine et cultivées en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5,10^{-8}$ . Ces cellules au lieu d'être polyédriques ont une forme arrondie et se détachent spontanément les unes des autres.

Peut-être y a-t-il là une voie nouvelle pour résoudre le problème de la culture de cellules isolées de plantes supérieures, qui n'a pas encore reçu de solution.

2. *PARTHENOCISSUS TRICUSPIDATA* (SIEB. et ZUCC.) PLANCH. — Nous avons obtenu en culture deux types de tissus de Vigne-vierge, que nous étudierons successivement. Ce sont des tissus sensibilisés et des tissus accoutumés à l'hétéroauxine.

a. *Tissus sensibilisés*. — Nous avons vu au chapitre précédent qu'il était impossible d'obtenir le développement de fragments de tige de Vigne-vierge en l'absence d'hétéroauxine, mais qu'il suffisait d'incorporer ce produit aux milieux de culture pour

observer la formation de cals volumineux. Le repiquage de ces néoformations ne présente aucune difficulté. Il suffit de découper dans les cals de petits prismes d'environ 4 à 5 millimètres de côté et de les placer à la surface d'un milieu renfermant de l'acide naphthyle acétique à des concentrations comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$ , pour les voir se développer rapidement. Le fragment augmente de volume, forme des masses arrondies lobées et légèrement chlorophylliennes, lorsqu'on les expose à la lumière (pl. XIV, fig. B). Ces tissus sont souvent hérissés d'une multitude de curieuses formations composées de

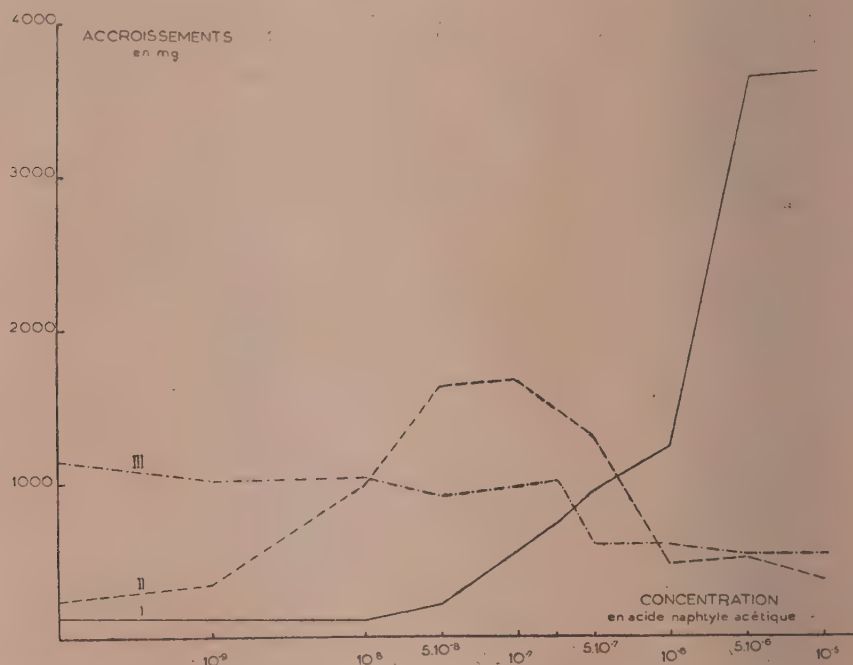


FIG. 18. — Action de l'acide  $\alpha$  naphthyle acétique sur la croissance des tissus de *Parthenocissus tricuspidata*.

La courbe I, en trait plein, correspond au développement de fragments de tige n'ayant jamais subi l'action de l'hétéroauxine, on remarque que l'acide naphthyle acétique exalte considérablement la prolifération de ces tissus qui ne se développent pas en son absence.

La courbe II, en tirets, correspond à des tissus ayant été cultivés pendant quelque temps sur un milieu renfermant de l'hétéroauxine à des concentrations variant de  $10^{-7}$  à  $5 \cdot 10^{-7}$  et ayant subi une première modification de leurs propriétés. Ces tissus sont comme les précédents incapables de se développer sans hétéroauxine, mais ils présentent une sensibilité accrue à l'égard de l'acide naphthyle acétique.

La courbe III, en points et tirets, correspond à des tissus qui sont la suite d'une culture prolongée en présence d'hétéroauxine, ont subi le phénomène d'accoutumance. Ils sont capables de s'accroître très activement sans hétéroauxine, et sont en outre insensibles à l'action excito-formatrice de cette substance.

longues files cellulaires réunies en faisceaux irréguliers et isolés les uns des autres (pl. XV, fig. A). Nous avons ainsi isolé une souche actuellement âgée de quatre ans ayant subi 25 repiquages.

1. Caractères physiologiques. — Étant donné que, pour obtenir des cultures à partir de fragments suffisamment volumineux pour être repiqués, il faut faire agir des doses d'hétéroauxine relativement élevées ( $10^{-7}$  à  $5 \cdot 10^{-7}$ ), on pouvait se demander si les tissus



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Détail de la surface d'une culture de *Parthenocissus tricuspidata*. Elle est toute couverte d'une multitude de formations composées de longues files de cellules réunies en faisceaux irréguliers.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Culture de *Parthenocissus tricuspidata* ayant manifesté le phénomène d'accoutumance à l'hétéro-auxine. Elle est formée de nodules qui évoluent indépendamment et tendent à se réparer les uns des autres.



ainsi obtenus étaient bien des tissus normaux ou s'ils s'étaient déjà modifiés sous l'action de ce produit. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé la sensibilité de ces tissus avec celle de tissus n'ayant jamais subi l'action de l'hétéroauxine.

Pour cela, nous avons mis en culture des fragments de tige sur un milieu renfermant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $10^{-6}$  et, deux mois plus tard, nous avons repiqué les cals ainsi obtenus sur une série de milieux qui renfermaient cette substance à des doses allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  ainsi que sur d'autres n'en contenant pas. Nous avons ainsi constaté qu'en l'absence d'hétéroauxine, l'accroissement était très faible; en deux mois, l'augmentation de poids d'un fragment initial de 150 milligrammes n'était en effet que de 280 milligrammes. Cette croissance paraissait provoquée par l'hétéroauxine résiduelle du fragment ensemencé, car, au second passage sur des milieux sans acide naphthyle acétique, l'augmentation n'était plus que de 85 milligrammes en deux mois. Vers  $5.10^{-9}$ , l'action excitoformatrice de la substance active commençait à se manifester. Elle atteignait un maximum vers  $10^{-7}$  et devenait ensuite toxique (fig. 18).

Nous avons ensemencé parallèlement de jeunes fragments de tige pesant en moyenne 150 milligrammes sur une série de milieux contenant de l'acide naphthyle acétique à des concentrations croissantes de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$ , et sur d'autres n'en renfermant pas. Cette expérience nous a tout d'abord permis de vérifier que, sans hétéroauxine, l'augmentation de poids des explantats est négligeable. Elle nous a montré, en outre, que, comme ceux de la Vigne, les tissus de Vigne-vierge qui ont subi une première fois l'action de fortes doses d'hétéroauxine présentent ensuite une sensibilité accrue à l'égard de cette substance. En effet, l'acide naphthyle acétique ne manifeste son action sur les tissus normaux de la tige qu'à une concentration supérieure à  $5.10^{-8}$ , dose dix fois plus forte que celle à laquelle commencent à réagir les tissus repiqués. Enfin, nous avons observé que la concentration optimale pour des fragments de tige était de  $5.10^{-6}$ , dose cinquante fois plus forte que celle qui provoque le meilleur développement des tissus repiqués et très toxique pour ces derniers. Les tissus normaux de Vigne-vierge sont beaucoup moins sensibles à l'acide naphthyle acétique que les tissus cultivés en présence de ce produit, puisque son action n'est appréciable qu'à partir de  $5.10^{-8}$ , soit, pour des doses dix fois plus fortes que celles qui activent déjà le développement de des derniers. Enfin, nous avons observé les plus forts développements à des concentrations très élevées  $5.10^{-6}$ , qui causent de graves troubles aux tissus précédents.

Il semble donc que les tissus de Vigne-vierge qui ont subi l'action de doses moyennes d'acide naphthyle acétique soient sensibilisés à l'égard de cette substance, comme c'est le cas pour les tissus de Vigne dont nous avons parlé précédemment. Toutefois, à la suite de cette transformation, ils n'acquièrent pas, comme ces derniers, le pouvoir de proliférer de façon durable sans hétéroauxine, car, lorsqu'on les repique à nouveau sur des milieux privés de cette substance, ils cessent de se développer. Remarquons, enfin, que l'accroissement des cultures de fragments de tige en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration optimum est beaucoup plus important que celui des tissus de la souche repiquée, puisque ces fragments augmentent de près de 4 grammes en deux mois alors que les cultures normales s'accroissent à peine de 2 grammes durant la même période. Peut-être cette différence est-elle due au fait qu'étant moins sensibles aux effets toxiques de l'hétéroauxine, elles peuvent utiliser des quantités plus fortes de ce produit.

2. Structure anatomique. — Nous avons montré dans le chapitre précédent que les cals produits par des fragments de tige de *Parthenocissus* sont formés d'un parenchyme

indifférencié. Les tissus repiqués au contraire se différencient, mais très légèrement. Ils sont tout d'abord formés d'un parenchyme homogène, puis à la périphérie des vieilles cultures dans les régions qui ne prolifèrent que faiblement, il apparaît des fragments de zone génératrice qui ont la même orientation inverse que dans les tissus de Vigne, c'est-à-dire qu'ils produisent des vaisseaux vers la périphérie et du liber vers l'intérieur de la colonie (fig. 19). Parfois, ces zones génératrices se cyclisent et forment de petits nodules cribrovasculaires typiques. Beaucoup de ces cellules élaborent des tannins et certaines forment des raphides d'oxalate de calcium analogues à celles que l'on rencontre dans le parenchyme libérien de la tige.

b. *Tissus accoutumés*. — 1. Caractères physiologiques. — Dans le but de vérifier que les tissus de Vigne-vierge sont incapables de proliférer *in vitro* en l'absence d'hétéro-

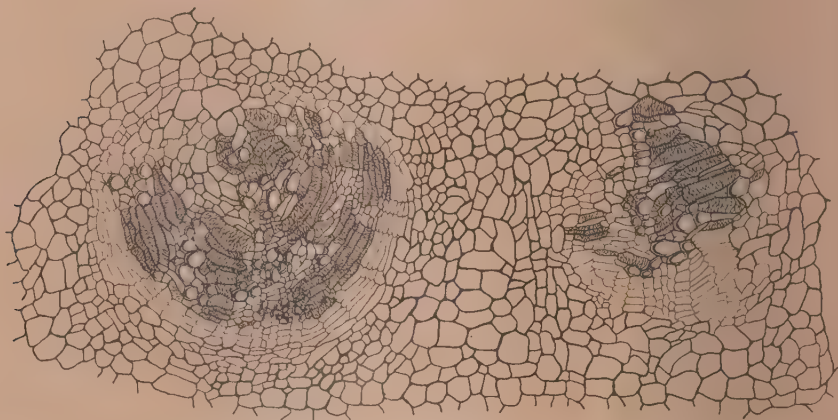


FIG. 19. — Coupe d'une culture de tissus de *Parthenocissus tricuspidata* ayant subi le phénomène de sensibilisation à l'hétéroauxine. Elle est composée d'un parenchyme où l'on rencontre des zones génératrices libéroligneuses fragmentaires ayant tendance à se cycliser pour former des nodules cribrovasculaires.

auxine, nous les avons repiqués, à plusieurs reprises, sur des milieux dépourvus de substances de ce type. Au premier passage, l'augmentation est d'environ 200 milligrammes en deux mois, au second elle s'est abaissée à 80 milligrammes et en replaçant à nouveau, au bout de deux mois, ces tissus sur un milieu neuf, nous avons constaté qu'ils demeuraient vivants sans s'accroître. Toutefois, l'une des cultures s'est mise à proliférer pour former un cal possédant un aspect très différent des tissus normaux. Alors que ceux-ci forment des masses régulières peu lobées et légèrement chlorophylliennes lorsqu'on les expose à la lumière, ce dernier était uniquement coloré en rose et semblait composé d'une série de nodules agglomérés et se séparant les uns des autres par simple pression (pl. XV, fig. B). Nous avons repiqué ce cal sur des milieux ne renfermant pas d'hétéroauxine; nous avons pu ainsi isoler une souche qui prolifère très intensément et conserve ces caractères morphologiques spéciaux.

Nous avons étudié l'action de l'acide naphthyle acétique sur les tissus qui avaient subi cette modification en les repiquant sur des milieux renfermant différentes doses d'hétéroauxine, ainsi que sur des témoins qui n'en contiennent pas (fig. 18), nous avons constaté qu'ils avaient perdu toute sensibilité vis-à-vis des propriétés excitoformatrices de ce

produit. Ils étaient devenus capables de se développer en l'absence d'hétéroauxine aussi activement que sur des milieux qui en contenaient des doses favorisant la croissance des tissus normaux. Ils avaient donc subi le phénomène d'accoutumance.

2. Structure anatomique. — Les tissus de la souche accoutumée à l'hétéroauxine sont reconnaissables non seulement à leur aspect extérieur, mais également à leur structure anatomique spéciale. Ils sont formés d'un parenchyme à grandes cellules au sein duquel apparaissent un grand nombre d'îlots de petits éléments en voie de prolifération intense (fig. 20). Ces îlots semblent provenir du recloisonnement des grandes cellules du parenchyme qui se multiplient activement pour former des nodules parenchymateux, ayant peu de cohésion entre eux, ce qui explique la fragilité de ces tissus. Ils renfer-

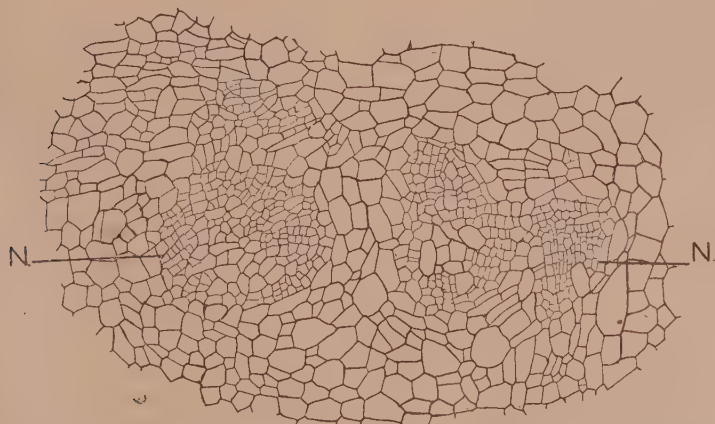


FIG. 20. — Coupe d'une culture de tissus de *Parthenocissus tricuspidata* ayant manifesté le phénomène d'accoutumance à l'hétéroauxine. Elle renferme des régions méristématiques N qui prolifèrent intensément pour former des nodules de parenchyme sans cohésion entre eux (N).

ment en outre un certain nombre de formations cribrovasculaires cyclisées analogues à celles que l'on rencontre dans les tissus normaux.

En résumé, les tissus de Vigne-vierge qui sont normalement incapables de proliférer *in vitro* sans hétéroauxine, se développent vigoureusement au contraire, en présence de ce produit, et comme ceux de la Vigne, peuvent subir successivement deux transformations profondes de leur pouvoir de croissance. Leurs cellules commencent par manifester une exaltation de leur sensibilité vis-à-vis des hétéroauxines, puis dans certains cas, elles deviennent capables de se multiplier très intensément en l'absence de ce produit, mais perdent leur sensibilité vis-à-vis de son action excitoformatrice ; elles subissent donc un phénomène d'accoutumance à l'hétéroauxine.

3. *PARTHENOCISSUS QUINQUEFOLIA* (L) PLANCH. — Nous serons beaucoup plus bref dans la description des cultures de tissus de *Parthenocissus quinquefolia*, car leurs caractères sont analogues à ceux des colonies de *Parthenocissus tricuspidata*, et, de ce fait, ne nous ont pas paru nécessiter de recherches étendues. En repiquant les cals qui se forment en présence d'acide naphthyle acétique à des concentrations variant de  $10^{-7}$  à  $5.10^{-7}$  sur les fragments de tige de *P. quinquefolia*, ou les curieux nodules qui se

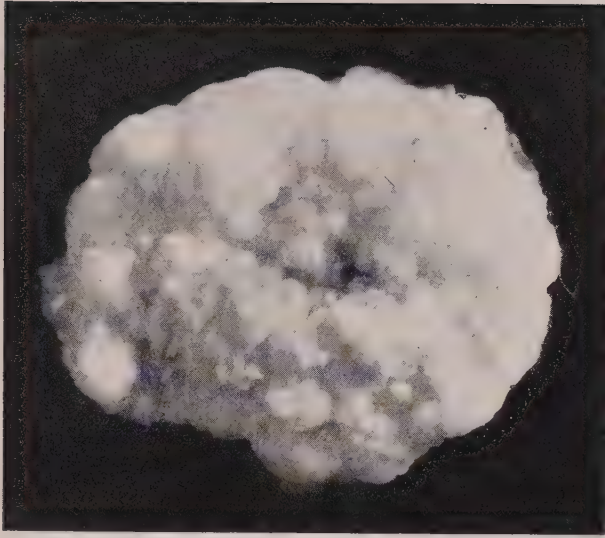
développent sur les racines, nous sommes parvenus aisément à isoler une souche de tissus qui se développent toutefois moins rapidement que ceux de *P. tricuspidata*. Ces cultures sont légèrement chlorophylliennes si on les expose à la lumière et, en outre, elles sont souvent colorées en rose par de l'anthocyane, alors que celles de *P. tricuspidata* n'élaborent habituellement pas de pigment anthocyannique. Ces colonies ne perdent jamais complètement la faculté de former des racines; toutefois, après plusieurs années de cultures, celles-ci deviennent rares et n'apparaissent guère que sur une faible proportion des cultures. Ces cultures, comme celles de *P. tricuspidata*, sont formées d'un parenchyme peu différencié, où l'on distingue çà et là quelques nodules cribrovasculaires. La souche que nous avons isolée est actuellement âgée de quatre ans (juin 1948) et a subi 25 repiquages.

4. *CISSUS INCISA* (TORR. et GR.) DESM. — La croissance des tissus de *Cissus incisa* est en tous points comparable à celle des cultures de *Parthenocissus quinquefolia*, si bien qu'il est parfois difficile de distinguer les colonies de ces deux espèces. Pour cette plante, nous avons fait des isoléments à partir de fragments de tige et de racine charnue; les repiquages des néoformations apparues sur ces deux types d'organes nous ont fourni des cultures absolument identiques. Nous en entretenons une souche âgée actuellement de quarante-deux mois, (juin 1948) elle a subi 20 repiquages.

5. *CISSUS DISCOLOR* WENT. — Les cultures de *Cissus discolor* se développent très lentement en comparaison des colonies tissulaires des autres Ampélidées et n'atteignent jamais de grandes dimensions. Leur poids moyen ne dépasse pas 500 milligrammes. Ces cultures sont toujours assez fortement colorées en rouge brun par des anthocyanes ou des tannins. Leur croissance très irrégulière au cours des huit premiers mois qui suivent l'isolement s'est alors brusquement améliorée. Nous avons constaté que ces tissus étaient devenus capables de proliférer sans hétéroauxine aussi rapidement que lorsqu'on leur fournissait cette substance. Ils avaient donc subi le phénomène d'accoutumance. Des coupes anatomiques nous ont permis de constater que ces colonies sont toujours beaucoup plus différenciées que tous les tissus que nous venons d'examiner. Le *Cissus discolor* est la seule plante de cette famille dont les tissus produisent *in vitro* une grande quantité de nodules cribrovasculaires; ceci contraste étrangement avec la structure des tiges des plantes entières qui sont, au contraire, très peu lignifiées et beaucoup moins différenciées que celles des autres espèces que nous avons étudiées. La souche que nous avons isolée âgée de trois ans a subi 18 repiquages.

6. *RUBUS FRUTICOSUS* L. — a. Caractères physiologiques. — Les néoformations qui apparaissent sur des fragments de tige de *Rubus fruticosus* peuvent être repiquées avec la plus grande facilité. Ces tissus, comme ceux de *Parthenocissus*, sont indifférenciés et constitués en majeure partie par des cellules parenchymateuses capables de se multiplier. Leur croissance n'est pas, comme celle des tissus de Vigne, localisée en des régions privilégiées, mais toujours plus ou moins diffuse. Les fragments de cal primitif placés à la surface de milieux contenant de l'acide naphthyle acétique à des concentrations variant de  $10^{-7}$  à  $3 \cdot 10^{-7}$  s'accroissent rapidement pour former des masses parenchymateuses jaunâtres peu mamelonnées (pl. XVI, fig. A). Ces cultures secrètent une substance formant un précipité blanchâtre qui s'accumule dans la gélose à leur contact.

Nous n'avons pas étudié de façon précise l'action de l'hétéroauxine sur la croissance des tissus normaux de cette plante, mais seulement sur ceux de souches ayant déjà été



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Culture de tissus de Ronce âgée de deux mois provenant d'une souche âgée de dix mois (5° repiquage).



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Culture de tissus de Poirier âgée de deux mois provenant d'une souche âgée d'un an. (6° repiquage.)

Remarquer qu'elle a produit des racines.



repiquées plusieurs fois en présence de concentrations assez élevées de l'ordre de  $5.10^{-7}$  à  $10^{-6}$ . Nous avons alors constaté que ces tissus peuvent proliférer indéfiniment sans hétéroauxine et qu'ils ne possèdent aucune sensibilité vis-à-vis des effets excitomateurs de ce produit; par contre, l'acide naphthyle acétique exerce dès la concentration de  $10^{-7}$  une action inhibitrice très nette sur la croissance et, à la dose de  $10^{-5}$  il est très toxique pour ces tissus, dont la croissance se trouve alors arrêtée; ils se



FIG. 21. — Nodule cribrovasculaire produit par une culture de tissus de *Rubus fruticosus*.

comportent donc comme des tissus accoutumés à l'hétéroauxine. La souche que nous avons isolée est âgée actuellement de quatre ans et a subi 24 repiquages.

*b. Structure anatomique.* — La structure anatomique de ces cultures, comme celle des cals primitifs, est très simple. Elles sont formées d'un parenchyme homogène, riche en cellules à tannin. Toutefois, il apparaît çà et là dans ce parenchyme un certain nombre de nodules cribrovasculaires formés d'un petit groupe de vaisseaux aberrants entourés d'une zone génératrice libéroligneuse cyclisée produisant des vaisseaux vers l'intérieur et des cellules libériennes vers l'extérieur (fig. 21). Ces formations demeurent rares et prennent peu d'extension.

Signalons enfin que les cals qui se forment sur les tiges de *Rubus reflexus* sont également très faciles à repiquer en présence d'hétéroauxine à la concentration de  $5.10^{-7}$  et que l'aspect des cultures de cette espèce rappelle beaucoup celle des tissus de *Rubus fruticosus*. Nous n'avons pas étudié l'action de l'hétéroauxine sur cette espèce.

## II. Tissus d'arbres.

Ainsi que nous l'avons signalé, les premières tentatives de culture de tissus de différents arbres réalisées par GAUTHERET avaient été assez peu encourageantes et l'on pouvait

se demander si les milieux mis au point pour la culture des organes charnus de plantes herbacées pourraient assurer la survie indéfinie des tissus de végétaux ayant une structure et un mode de végétation très différents, les arbres par exemple.

Nous y sommes parvenus avec trois espèces l'Aubépine, le Poirier et le Lilas.

1. *CRATAEGUS MONOGYNA* JACQ. — Il est assez difficile de repiquer les cals qui se forment sur des fragments de tige d'Aubépine cultivés *in vitro*. Les parties sectionnées par le scalpel brunissent rapidement à l'air et prolifèrent ensuite très difficilement. Il faut donc réduire les blessures au minimum au cours de cette opération.

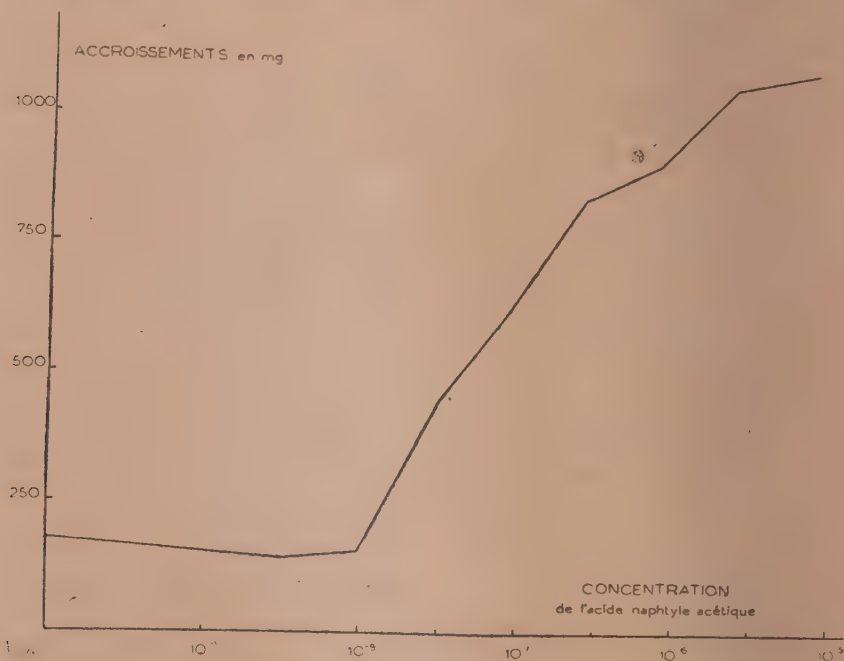


FIG. 22. — Action de l'acide naphthyle acétique sur la croissance des tissus de *Crataegus monogyna* cultivés *in vitro*.

Remarquer que les tissus ne s'accroissent à peu près pas en absence d'hétéroauxine; ce produit commence à manifester son action à partir de la concentration de 10<sup>-8</sup>. La courbe s'élève ensuite régulièrement jusqu'à la concentration de 10<sup>-5</sup> sans que l'on observe d'effet toxique.

La croissance des explantats n'est jamais diffuse mais limitée à certains points privilégiés où se forme un nouveau cal qui s'accroît peu à peu, pour donner une masse de parenchyme très irrégulièrement mamelonnée, qui s'étale peu à peu en croûte mince à la surface de la gélose.

a. Caractères physiologiques. — Comme pour les tissus de Vigne et de Vigne-vierge, la concentration en hétéroauxine exerce une action considérable sur la croissance. Lorsqu'on repique les cals obtenus par la prolifération de tronçons de tige sur une série de milieux renfermant des doses d'acide naphthyle acétique allant de 10<sup>-9</sup> à 10<sup>-5</sup>, et sur des témoins n'en renfermant pas, on constate qu'en l'absence de substances de croissance (fig. 22),

le développement des explantats est pratiquement nul. Ceux-ci ne commencent à s'accroître d'une manière sensible que lorsque la concentration du milieu atteint  $5 \cdot 10^{-8}$ . Dans ces conditions, leur développement est très irrégulier. Certains augmentent de 700-milligrammes en deux mois tandis que d'autres ne s'accroissent que de 230 milligrammes pendant la même période. À partir d'une teneur comprise entre 3 et  $5 \cdot 10^{-7}$ , la croissance est beaucoup plus régulière. Toutes les cultures se développent de façon analogue; enfin, pour des teneurs variant de  $10^{-6}$  à  $10^{-5}$ , le développement est considérable et l'accroissement moyen de chaque culture en deux mois dépasse 1 gramme. C'est donc entre  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  que l'on observe la prolifération la plus active des tissus d'Aubépine. Toutefois, étant donné que ces doses sont déjà nettement toxiques pour

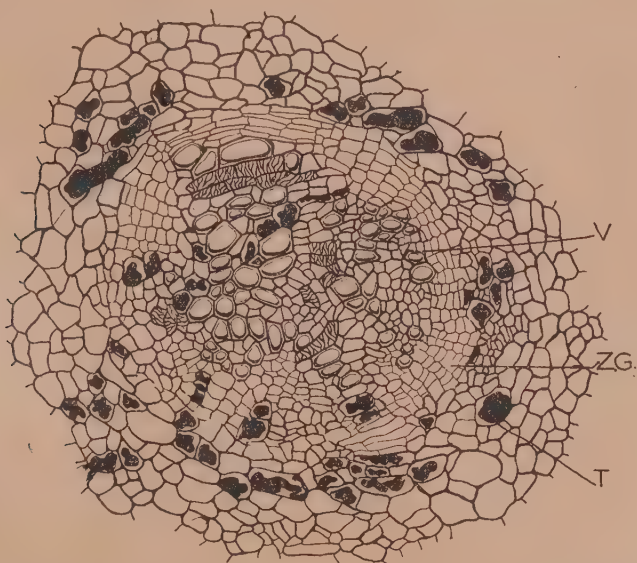


FIG. 23. — Nodule cribrovasculaire produit par une culture de tissus de *Crataegus monogyna*.

V. : Vaisseaux; T. : Cellules à tannin; ZG. : Zone génératrice.

Il est constitué par une zone génératrice circulaire produisant du parenchyme vasculaire vers l'intérieur et du liber vers l'extérieur.

la plupart des espèces que nous avons cultivées et produisent une désorganisation des tissus, nous avons repiqué ceux d'Aubépine sur des milieux contenant une teneur en acide naphthyle acétique un peu plus faible, de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-7}$ . Au cours des premiers passages, le développement a été assez irrégulier. Un certain nombre de cultures sont mortes et d'autres sont demeurées vivantes, mais n'ont pas proliféré. Nous avons cherché à améliorer la croissance en incorporant au milieu nutritif différentes substances vitaminiques comme de l'acide *d*-pantothénique, de la Biotine et de l'Inositol. Nous avons constaté, par l'aspect des cultures, que le développement était renforcé lorsque le milieu renfermait de l'acide *d*-pantothénique à la dose de  $10^{-6}$ , de la Biotine à la dose de  $10^{-8}$  et de l'Inositol à la dose de  $10^{-4}$ . L'augmentation du poids moyen des cultures après deux mois était de 30 à 45 p. 100 supérieure lorsque les explantats étaient cultivés en présence de ces facteurs de croissance. Toutefois, aucun d'eux n'est

indispensable à la croissance des tissus d'Aubépine, car ceux-ci paraissent capables de proliférer de façon indéfinie en leur absence. La souche que nous avons isolée est actuellement âgée de 42 mois et a subi 22 repiquages.

Nous avons enfin comparé la sensibilité à l'hétéroauxine des tissus des cals formés par des fragments de tige et de ceux provenant d'une souche ayant été cultivée pendant deux ans sur des milieux renfermant de l'acide naphthyle acétique à des concentrations variant de  $5.10^{-7}$  à  $10^{-6}$ . Cette comparaison ne nous a permis de mettre en évidence aucune différence de sensibilité. Ainsi, les tissus d'Aubépine dans les conditions où nous les avons étudiés, ne paraissent pas subir les phénomènes de sensibilisation et d'accoutumance que nous avons observés avec la plupart des tissus de lianes.

b. Structure anatomique. — Les cultures de tissus d'Aubépine possèdent une structure anatomique qui rappelle beaucoup celle des cultures de Ronce. Comme ces dernières, elles sont constituées par un parenchyme très peu différencié contenant quelques rares nodules cribrovasculaires se formant dans les parties les plus âgées; mais, cette transformation est toujours très limitée. De plus, la partie vasculaire du nodule qui est très étendue, n'est pas entièrement lignifiée, mais est formée d'un parenchyme renfermant de nombreux vaisseaux. La plupart de ces cellules élaborent de grandes quantités de tannins qui précipitent par le fixateur, forment des amas bleu foncé après coloration des préparations par le bleu de méthylène (fig. 23).

2. *PYRUS COMMUNIS* L. var. «Conférence». — Les tissus de Poirier ont un mode de développement analogue à ceux d'Aubépine. Comme ces derniers, ils ne se développent bien qu'en présence d'hétéroauxine à des concentrations assez élevées de l'ordre de  $10^{-5}$ . Ils paraissent toutefois plus sensibles que ceux d'Aubépine à l'action toxique de l'acide naphthyle acétique, car, dès que la concentration atteint  $10^{-6}$ , les tissus perdent toute consistance. Ils deviennent mous et translucides et se désorganisent entièrement par suite de la transformation de leurs cellules en éléments géants. Ces cultures produisent assez souvent des racines qui s'enfoncent dans le milieu (pl. XVI. fig. B). Ce phénomène est assez surprenant car les nombreux essais de bouturage de cette plante ont constamment donné des résultats négatifs. Enfin, la structure anatomique de ces tissus les rapproche également de ceux des cultures d'Aubépine. Comme ces dernières, les tissus de Poirier en culture sont constitués par un parenchyme très peu différencié renfermant une grande quantité de tannins. Ces tannins s'accumulent dans le milieu de culture qu'ils colorent en brun foncé au contact de l'explantat. Contrairement à ce qu'a observé Jacquiot (33) avec des tissus de Chêne et de Châtaignier, cette accumulation de tannins ne paraît pas gêner le développement des tissus.

3. *SYMBIGA VULGARIS* L. var. «Madame Florent Stepmann». Les cals volumineux de parenchyme homogène que produisent les segments de tige de Lilas ensemencés sur des milieux renfermant de l'hétéroauxine, sont très faciles à repiquer. Lorsqu'on place un fragment de ces cals sur un milieu renfermant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $3.10^{-7}$ , il continue à proliférer avec vigueur en s'arrondissant pour donner une masse légèrement mamelonnée qui, en deux mois, recouvre toute la surface de la gélose. La croissance est régulière et homogène dès le premier repiquage.

a. Caractères physiologiques. — Nous avons étudié l'action de l'hétéroauxine sur ces tissus et pour cela, nous en avons repiqué des fragments sur des milieux ne contenant

pas de produit et sur d'autres renfermant de l'acide naphthyle acétique à des concentrations variant de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$ . Nous avons pu constater à l'aide de pesées que, en l'absence d'hétéroauxine, ces tissus cessent de se développer. Cette substance ne commence à faire sentir son action qu'à la dose de  $10^{-7}$  et c'est à  $5 \cdot 10^{-6}$  que son activité devient maximum. Ces expériences nous montrent que les tissus de Lilas sont peu sensibles aux effets excitoformateurs de l'acide naphthyle acétique, puisqu'ils ne commencent à réagir qu'à des concentrations déjà fortes. Ils sont également peu sensibles à l'action toxique de ce

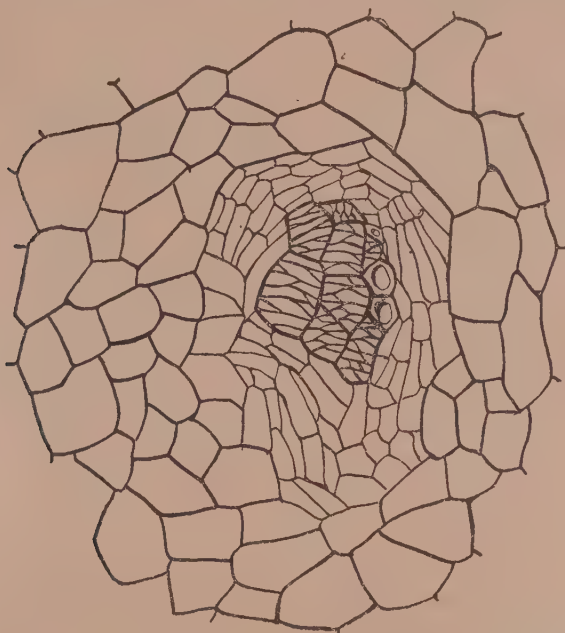


FIG. 24. — Vaisseaux aberrants produits par une culture de tissus de *Syringa vulgaris*.

produit qui n'inhibe la croissance qu'à la dose très élevée de  $10^{-5}$ . La souche que nous avons isolée est actuellement âgée de 25 mois et a subi 12 repiquages (juin 1948).

*b. Structure anatomique.* — Les tissus de Lilas cultivés *in vitro* ont une structure très homogène. L'examen de préparations anatomiques montre qu'ils sont formés par un parenchyme presque entièrement indifférencié formé de cellules très régulières. Il se forme parfois quelques vaisseaux aberrants dans les parties internes de la colonie qui prolifèrent le moins activement (fig. 24). Mais ces formations apparaissent très tardivement après plusieurs mois de culture et sont toujours très limitées, si bien que ces cultures sont constituées presque uniquement de parenchyme à l'état pur.

En résumé, les trois tissus d'arbres que nous avons étudiés, Aubépine, Poirier, Lilas, se développent normalement *in vitro* sur des milieux de composition analogue à ceux qui assurent la croissance des tissus de plantes herbacées et paraissent capables de survie indéfinie.

### III. Tissus de plantes herbacées.

L'isolement de souches de tissus à partir des cals qui se forment lorsqu'on cultive des fragments de tiges de plantes herbacées est difficile à réaliser. En effet ces cals ne sont pas formés de parenchyme homogène comme ceux que produisent les plantes ligneuses, mais renferment de nombreuses formations cribrovasculaires peu capables de proliférer *in vitro*. D'autre part, la croissance de ces tissus est limitée à certaines de leurs régions périphériques qu'il importe donc de ne pas léser.

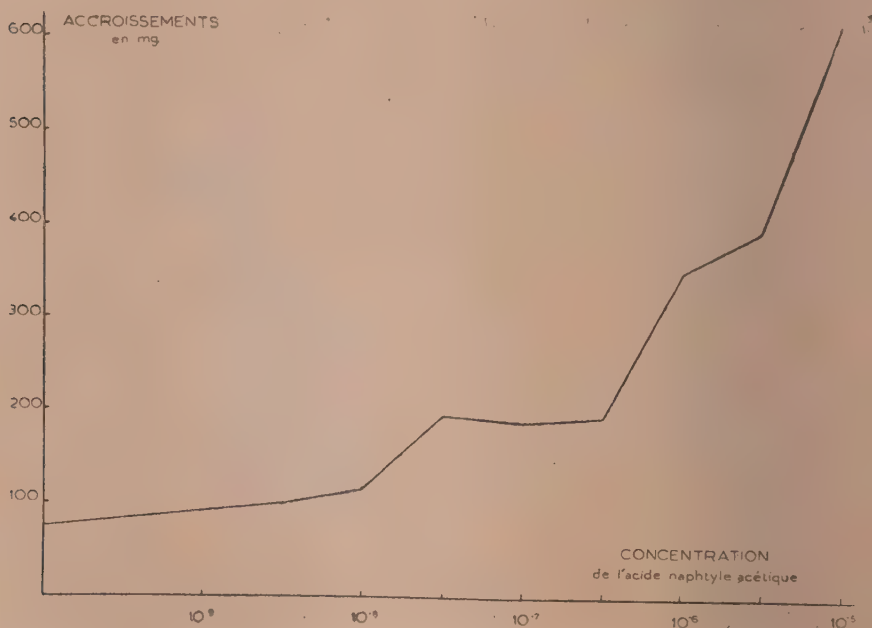


FIG. 25. — Action de l'acide naphthyle acétique sur la croissance des tissus d'*Antirrhinum majus* cultivés *in vitro*.

Ces tissus prolifèrent à peine sans hétéroauxine. Il faut faire agir des doses élevées d'acide naphthyle acétique ( $10^{-6}$ ) pour observer un accroissement notable.

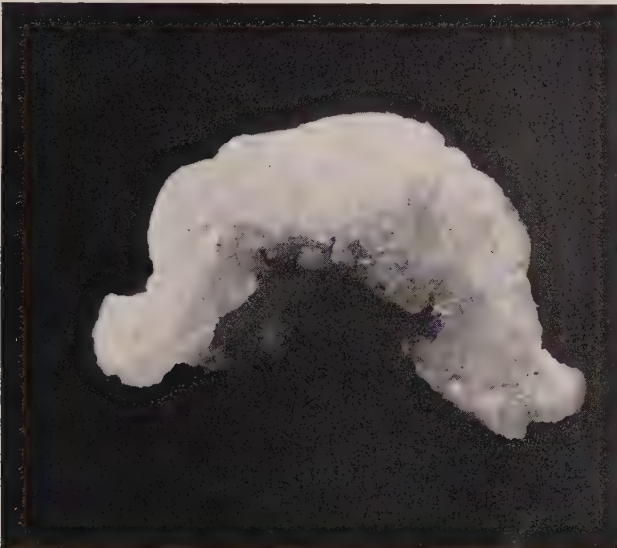
Enfin, les tissus de la plupart de ces espèces sont très sensibles à l'action des hétéroauxines et, de ce fait, on doit préciser très exactement la dose optimum au delà de laquelle ces substances deviennent toxiques.

1. *ANTIRRHINUM MAJUS* L. — Les cals primitifs qui se développent sur des fragments de tige de Muflier ne deviennent jamais très volumineux. Pour procéder à leur repiquage, il suffit de les séparer de la tige et de les transporter entiers à la surface d'un nouveau milieu. Leur croissance s'y poursuit très lentement, les tissus néoformés s'étalent en croûte mince à la surface de la gélose pour former un disque aplati de parenchyme légèrement mamelonné. Ces tissus deviennent chlorophylliens lorsqu'on les expose à la



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Culture de tissus de *Malva sylvestris* formée d'un enchevêtrement de racines tuméfiées (souche rhizogène).



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Coupe d'une culture de *Malva sylvestris*; cette culture est très bombée et creuse à l'intérieur (souche non rhizogène).



lumière. Toute leur surface est recouverte de pseudothalles et ils émettent fréquemment des racines. Cependant l'intensité de la rhizogénèse des colonies diminue peu à peu au cours des repiquages successifs et après plusieurs années finit par disparaître complètement. Ces cultures prolifèrent très lentement. Leur accroissement moyen n'est que de 300 à 400 milligrammes en deux mois. Nous en avons isolé une souche qui prolifère depuis trois ans et a déjà subi 18 repiquages (juin 1948).

a. Caractères physiologiques. — Nous avons cherché à déterminer la concentration en hétéroauxine la plus favorable au développement de ces tissus et, pour cela, nous avons repiqué des fragments de poids connu sur des milieux contenant de l'acide naphthyle acétique à des concentrations variant de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  et sur des milieux témoins n'en contenant pas. Nous en avons ainsi constaté (fig. 25) que, sans hétéroauxine, ils cessent de se développer, mais demeurent néanmoins vivants pendant plusieurs mois. L'action excitoformatrice de cette substance se manifeste à partir d'une dose de l'ordre de  $5.10^{-8}$ ; toutefois, à cette concentration, la croissance est encore très lente; elle ne s'améliore vraiment que lorsque la concentration atteint  $5.10^{-7}$  et ce produit semble atteindre son efficacité maximum vers  $5.10^{-6}$ ; contrairement à ce qui se produit avec beaucoup de plantes, des doses supérieures à  $5.10^{-6}$  ne ralentissent pas sensiblement la croissance, mais elles provoquent néanmoins une action toxique qui se traduit par une dissociation des tissus et la formation de cellules géantes. Le Muflier est donc un exemple de plante peu sensible à l'hétéroauxine. Jamais nous n'avons observé dans nos cultures les phénomènes de sensibilisation ni d'accoutumance.

Nous entretenons notre souche sur des milieux renfermant de l'acide naphthyle acétique à des taux variant de  $3.10^{-7}$  à  $5.10^{-7}$ .

b. Structure anatomique. — L'observation anatomique montre que ces tissus sont très différenciés. Seules, certaines régions situées sur le pourtour demeurent à l'état méristématique et continuent à s'accroître; le reste est composé d'un parenchyme renfermant de très nombreux nodules cribrovasculaires, certains de ces nodules prennent un développement considérable et forment des plages ligneuses dont la structure rappelle celle d'une tige normale (fig. 26).

2. *MALVA SYLVESTRIS* L. — Ainsi que nous l'avons signalé dans le chapitre précédent, le tissu des plantes de la famille des Malvacées sont difficiles à cultiver *in vitro*, et nous avons effectué plusieurs tentatives infructueuses portant sur un certain nombre d'espèces avant de pouvoir isoler des souches capables de se développer indéfiniment. Les plantes qui nous ont fourni ces souches sont : *Malva sylvestris* L., *Althea thuringiaca* L. et *Althea officinalis* L.

Nous avons eu de grosses difficultés pour obtenir la survie indéfinie des tissus de Mauve; ce n'est qu'après plusieurs tentatives infructueuses que nous sommes parvenus à isoler deux souches d'aspect très différent que nous décrirons successivement. L'une de ces souches est très rhizogène, l'autre au contraire ne produit jamais de racines.

a. Souche rhizogène. — Lorsqu'on repique les cals volumineux qui se forment sur des fragments de tige de Mauve, la plupart cessent de se développer et ne tardent pas à mourir quelle que soit la concentration du milieu en hétéroauxine. Un très petit nombre conservent leur activité et produisent de curieux nodules formés d'un amas de racines enchevêtrées les unes dans les autres et renflées à leur base (pl. XVII, fig. A). Nous avons repiqué ces nodules pendant un an sur des milieux contenant de l'acide naphthyle acé-

tique à la concentration de  $3.10^{-7}$ . Ils ont proliféré régulièrement en continuant à produire des amas de racines analogues à ceux qui constituaient le nodule initial. Nous avons ensuite supprimé l'hétéroauxine du milieu et la souche a continué à proliférer de la même façon. En ne repiquant que les renflements qui se forment à la base de certaines de ces racines nous avons pu isoler une souche de tissus capable<sup>ab</sup> de proliférer d'une manière diffuse en produisant beaucoup moins d'organes, mais ces tissus étaient excessivement mous et fragiles et il nous a paru difficile de les utiliser pour les expériences de pathologie que nous désirions entreprendre; c'est pourquoi après deux ans de culture,

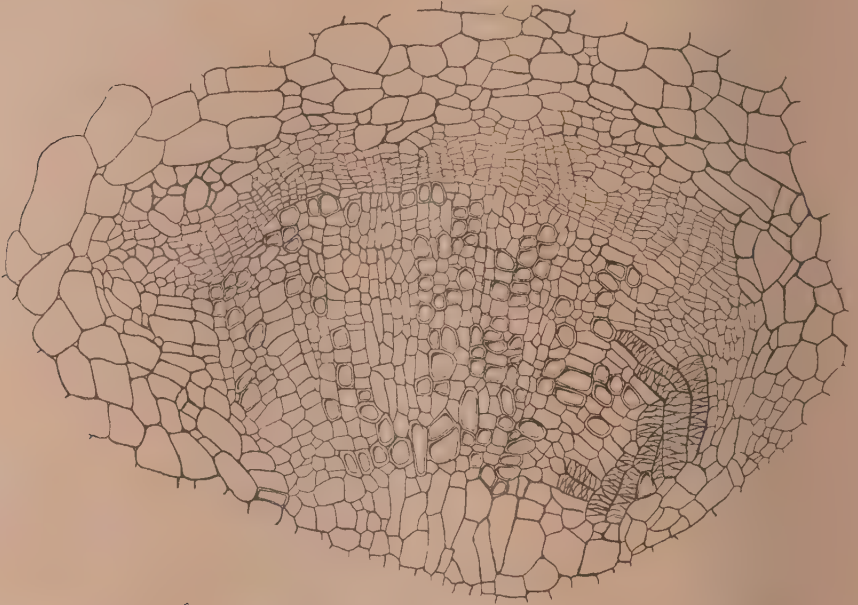


FIG. 26. — Nodule cribrovasculaire formé par une culture de tissus d'*Antirrhinum majus*.

Il est constitué par une zone génératrice semi-circulaire qui produit du côté de sa face interne du parenchyme vasculaire et de l'autre côté du parenchyme libérien.

nous avons abandonné cette souche pour tenter d'en isoler une nouvelle, formée de tissus plus compacts.

b. *Souche non rhizogène*. — 1. Caractères physiologiques. — Pour y parvenir, nous avons repiqué des fragments de cals primitifs sur des milieux renfermant des doses variées d'hétéroauxine et diverses vitamines; pyridoxine, biotine, méso-inositol et acide *d*-pantothénique. La croissance la plus active a été obtenue en combinant du méso-inositol à la concentration de  $10^{-4}$ , de la biotine à la concentration de  $10^{-8}$ , du pantothénate de calcium à la concentration de  $10^{-6}$  et de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ . Nous ne sommes toutefois pas assurés que ces vitamines soient réellement indispensables à la prolifération indéfinie des tissus; nous pensons plutôt qu'elles ont simplement une action stimulante qui favorise les premiers repiquages. Sur ce milieu, certains fragments formaient des amas très volumineux de tissus fermes et compacts. Mais la plupart cessaient de se développer et se nécrosaient rapidement. Nous

avons observé au cours des premiers passages une mortalité considérable atteignant 60 à 75 p. 100 des cultures, puis après cinq ou six repiquages certaines cultures se sont considérablement modifiées; elles sont devenues légèrement translucides, ont perdu complètement la faculté de produire des racines, et, au lieu d'être formées de tissus charnus, ont pris la forme d'une mince croûte bombée en forme de cloche et ne reposant sur la gélose que par ses bords (pl. XVII, fig. B). En repiquant les tissus qui s'étaient ainsi modifiés, nous avons constaté que leur croissance devenait très régulière et que la mortalité cessait presque entièrement.

Nous avons alors pu faire une étude quantitative de l'action de l'hétéroauxine en repiquant ces tissus sur des milieux de concentrations variées. Nous avons ainsi constaté qu'ils étaient devenus capables de se développer sans substance de croissance aussi activement que lorsqu'on leur fournissait de l'hétéroauxine. Ils avaient donc subi le phénomène d'accoutumance. Ainsi les tissus normaux de Mauve prolifèrent très difficilement en culture. Il paraît impossible de les maintenir en survie indéfinie. Les tissus accoutumés au contraire se développent intensément. Nous en avons isolé une souche qui prolifère actuellement depuis deux ans (juin 1948) et a subi 12 repiquages.

2. Structure anatomique. — Ces tissus accoutumés sont composés d'un grand nombre d'îlots méristématiques accolés les uns aux autres, disposés absolument au hasard, dans une masse parenchymateuse et proliférant de façon indépendante. Certaines cellules âgées se lignifient et s'entourent d'une zone génératrice circulaire produisant à l'extérieur des éléments libériens; il se forme ainsi de nombreux nodules cribrovasculaires répartis dans toute la culture. En outre, il se forme fréquemment dans ce parenchyme des ébauches de racines qui n'évoluent pas et ne parviennent pas à se développer au dehors. Cette disposition anarchique contraste avec la structure régulière des cals primitifs qui contiennent de longues zones génératrices, produisant d'épaisses assises de tissu ligneux bien organisé comme dans une tige normale.

3. *Althea*. — Les tissus des deux *Althea* : *Althea thuringiaca* L. et *Althea officinalis* L. que nous avons entrepris de cultiver se comporte *in vitro* de manière assez différente. Les fragments de tige de la première espèce produisent des cals volumineux réguliers peu chlorophylliens; ces cals repiqués en présence d'acide naphthyle acétique à des concentrations comprises entre 3 et  $5 \cdot 10^{-7}$  prolifèrent de façon irrégulière au cours des premiers passages, puis, peu à peu, la croissance s'améliore et au bout d'un an devient beaucoup plus homogène. Ces cultures comme celles de Mauve sont formées de nodules proliférant indépendamment et ayant une tendance marquée à se détacher les uns des autres et, après les premiers repiquages, elles ne produisent plus de racines. Nous avons ainsi isolé une souche qui prolifère depuis trois ans et a subi 18 repiquages. Les tissus produits par la Guimauve officinale sont, au contraire, excessivement compacts et peu mamelonnés, comme s'ils étaient recouverts d'un périoderme régulier; ils prolifèrent très lentement. La concentration optimum du milieu en acide indole acétique paraît être de  $5 \cdot 10^{-7}$  et, même dans ce cas, l'accroissement de fragments de 100 milligrammes est excessivement faible et ne dépasse pas 200 à 300 milligrammes, en deux mois. Ces tissus gardent leur structure compacte et se différencient profondément. Il se forme à l'intérieur du parenchyme des nodules cribrovasculaires de grande dimension, très coriaces et difficiles à sectionner avec un scalpel. Ces tissus ne perdent jamais la faculté d'émettre des racines, mais ces racines se développent peu; elles se forment surtout à l'air libre, et ne s'enfoncent pas profondément dans la gélose,

comme c'est le cas pour les autres espèces. Nous avons isolé une souche de tissus de chacune de ces deux plantes qui prolifèrent depuis trois ans et ont subi 18 repiquages.

4. *Nicotiana Tabacum* L. var. « White Burley ». — La culture de tissus de plantes atteintes de maladies à virus présente un très grand intérêt; sa réalisation doit en effet permettre de conserver facilement au laboratoire des souches actives dont l'entretien sur des plantes entières est toujours délicat en raison des contaminations accidentelles. D'autre part les cultures de tissus qui sont très homogènes, facilement maniables et se développent en milieu entièrement synthétique, constituent un matériel de choix pour l'étude physiologique de ces maladies. Or les virus les mieux connus actuellement sont ceux qui attaquent certaines Solanées : Virus de la Mosaïque du Tabac, Virus X et Virus Y de la Pomme de terre, Virus du Bushy stunt de la Tomate. La plupart se transmettent facilement au Tabac. Nous avons donc essayé de réaliser la culture indéfinie des tissus de cette plante afin d'obtenir *in vitro* le développement des Virus susceptibles de les infecter.

Nous avons obtenu des cultures de deux types de tissus : tissu normal et tissu accoutumé que nous allons décrire successivement :

a. *Tissus normaux*. — 1. Caractères physiologiques. — Il est très difficile d'obtenir des cultures de tissus normaux de Tabac. Lorsqu'on repique des fragments de cals initiaux formés sur des fragments de tige sur des milieux dépourvus d'hétéroauxine ou contenant celle-ci à des doses inférieures à  $10^{-7}$ , on constate que leur croissance s'arrête. Ils demeurent vivants pendant plusieurs mois en proliférant excessivement lentement, puis finissent par se nécroser. Si, au contraire, le milieu renferme de l'acide naphthyle acétique à des concentrations supérieures à  $10^{-7}$ , les tissus continuent à se développer, mais on constate qu'au lieu de demeurer fermes et compacts et de couleur blanc-jaunâtre, ils se modifient lentement, deviennent mous et translucides, se décolorent ou prennent une teinte brunâtre. Cette transformation est toutefois lente, et si le milieu ne contient que de faibles doses d'hétéroauxine, c'est-à-dire de 0,1 à 0,3 mgr. par litre ( $10^{-7}$  à  $3 \cdot 10^{-7}$ ), certaines parties du cal ne subissent pas cette modification et demeurent constituées de tissus fermes et compacts qui s'accroissent très lentement. En repiquant les minuscules fragments qui échappent à la transformation que nous venons de décrire, en présence d'acide naphthyle acétique à des concentrations voisines de  $10^{-7}$ , on parvient à les maintenir vivants pendant plus d'un an. Leur croissance est toutefois très lente et la mortalité est après chaque repiquage très élevée. Si bien que la plupart des souches finissent par périr.

2. Structure anatomique. — L'examen microscopique de ces tissus montre qu'ils sont constitués par des régions formées d'un parenchyme compact à cellules régulières renfermant de nombreux nodules cribrovasculaires analogues à ceux que l'on rencontre dans le cas primitif. A la périphérie de ce parenchyme on rencontre des amas volumineux de cellules transformées en éléments géants qui correspondent aux parties brunes de la colonie.

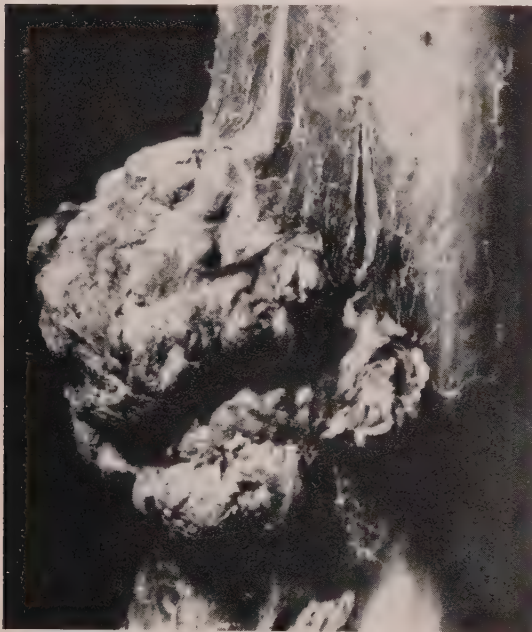
b. *Tissus accoutumés*. — 1. Caractères physiologiques. — Après un an de culture en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $10^{-7}$  nous avons constaté à plusieurs reprises que la croissance des colonies s'améliorait brusquement.

Elles s'accroissaient beaucoup plus rapidement et cessaient de produire des cellules géantes. A partir de ce moment le développement devenait beaucoup plus rapide et plus régulier, et se poursuivait normalement, même lorsqu'on supprimait l'acide naphthyle



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Tumeur produite sur un cep de vigne par une contamination spontanée de *Phytomonas tumefaciens*.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Crown Gall apparu sur un sarment de Vigne deux mois après l'inoculation du *Phytomonas tumefaciens*.



acétique des milieux de culture. Ces tissus avaient donc subi le phénomène de l'accoutumance à l'hétéroauxine. Ainsi, c'est seulement lorsqu'ils ont subi cette transformation que la culture des tissus du Tabac, comme ceux de la Mauve, devient facile. Cette transformation est donc favorable à la culture des tissus. Elle apparaît de façon tout à fait accidentelle dans des conditions impossibles à préciser. De plus, elle semble être beaucoup plus rare chez le Tabac que chez les tissus de Malvacées, ce qui contribue encore à augmenter les difficultés de cultiver les tissus de cette plante. Les cultures accoutumées forment d'abondantes masses de parenchyme régulièrement mamelonées et semblent avoir perdu la faculté de produire des racines. Nous en avons isolé une souche âgée actuellement de trois ans, qui a subi 18 repiquages.

2. Structure anatomique. — Ces colonies tissulaires de Tabac possèdent la structure caractéristique de la plupart des tissus accoutumés à l'hétéroauxine. Elles sont très hétérogènes et comme formées d'un certain nombre de nodules accolés et s'accroissant indépendamment les uns des autres. Ces nodules sont composés d'un parenchyme peu homogène qui renferme une grande quantité de formations cribrovasculaires disposées sans ordre apparent.

#### D. CULTURE DE TISSUS DE CROWN-GALL.

Les travaux fondamentaux d'ERWIN SMITH ont établi que les volumineuses tumeurs qui apparaissent fréquemment au collet de certains arbres et que l'on désigne pour cela sous le nom de « Crown Gall », sont causées par une bactérie spécifique : le *Phytomonas tumefaciens*. Il est facile de reproduire ces tumeurs chez un grand nombre de plantes, en leur inoculant cette bactérie. WHITE et BRAUN (81) ont pu, par divers artifices, éliminer la bactérie des tumeurs d'*Helianthus annuus* et de *Vinca rosea* et cultiver ensuite sans difficulté leurs tissus sur des milieux ne contenant pas d'hétéroauxine, alors que les tissus normaux de ces plantes sont, dans ces conditions, incapables de se développer; les tissus tumoraux semblent donc capables de proliférer *in vitro* beaucoup plus facilement que les tissus normaux correspondants. Les tentatives de WHITE et BRAUN nous ont incité à effectuer des cultures de tissus de « Crown Gall » de diverses plantes, soit dans le but de la comparer aux cultures de tissus normaux, soit pour réaliser la culture de tissus d'espèces dont la culture des tissus est difficile comme ceux des Malvacées ou de Tabac.

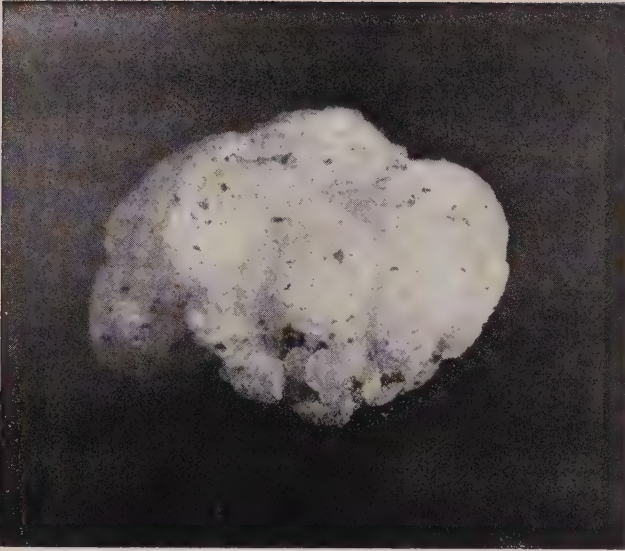
I. CULTURE DE TISSUS DE CROWN GALL DE *VITIS VINIFERA*. L. — a. Caractères morphologiques et physiologiques. — Dans les conditions naturelles la Vigne est très rarement attaquée par le *Phytomonas tumefaciens*. Des tumeurs causées par ce parasite ont cependant été signalées à plusieurs reprises par E. F. SMITH et ses collaborateurs (70), par L. NIEMEYER (57) et LIESKE (40). Ces auteurs ont pu reproduire expérimentalement des Crown-Galls sur divers cépages en leur inoculant la bactérie extraite de ces tumeurs. Nous avons nous-mêmes observé une très volumineuse tumeur spontanée sur un cep âgé (pl. XVIII, fig. A) et nous avons pu en extraire une souche virulente de *Phytomonas tumefaciens*. Nous avons également tenté à plusieurs reprises d'obtenir expérimentalement des tumeurs sur la Vigne; après de nombreuses tentatives infructueuses, nous y sommes finalement parvenu en inoculant la souche de *Phytomonas tumefaciens* A 6 de RIKER à de jeunes tiges de Vigne cultivées en serre. Ces tumeurs se sont développées très lentement et ne sont jamais devenues aussi volumineuses que

celles que l'on obtient en inoculant des plantes très sensibles comme le Soleil ou le *Pelargonium*. Après deux mois, les plus volumineuses atteignaient à peu près 0,5 cm. de diamètre; elles étaient de forme très irrégulière, profondément lobées et couvertes d'un liège épais, même lorsque les régions normales du sarment en étaient encore dépourvues (pl. XVIII, fig. B). Nous avons pu prélever aseptiquement de petits fragments des régions internes de ces tumeurs et nous les avons ensemencées sur des milieux dépourvus d'hétéroauxine. Ces fragments s'y sont développés rapidement et ont formé des masses volumineuses peu mamelonnées de tissus translucides recouvertes d'une mince couche de cellules brunes d'aspect subérifié (pl. XIX, fig. A). Nous avons pu très aisément en isoler une souche qui est actuellement âgée de deux ans et a subi 12 repiquages. Afin d'étudier les réactions de ce tissu tumoral vis-à-vis de l'acide naphthyle acétique, nous l'avons repiqué sur une gamme de milieux renfermant des doses d'hétéroauxine allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$ , ainsi que sur des témoins n'en contenant pas. Nous avons alors constaté que ces tissus tumoraux sont absolument insensibles à l'action excitoformatrice de l'hétéroauxine, et réagissent seulement à son action toxique qui se manifeste à partir de  $10^{-7}$ . Ainsi par leurs caractères physiologiques ces tissus se montrent très différents des tissus normaux et sensibilisés de Vigne qui sont très sensibles aux effets excitoformateurs de l'hétéroauxine (fig. 16). Par contre ils se rapprochent beaucoup des tissus accoutumés qui eux aussi ont perdu toute sensibilité vis-à-vis de cette substance de croissance et prolifèrent très rapidement sur des milieux qui en sont dépourvus:

b. Structure anatomique. — Ces colonies tumorales sont constituées d'un parenchyme à grandes cellules qui prend naissance à la suite de la division active d'une zone méristématique qui est située à la périphérie du cal et l'entoure entièrement. Ce parenchyme est très homogène. Il ne renferme que quelques rares îlots de cellules qui se lignifient, les autres demeurent constamment indifférenciées (fig. 27).

II. CULTURE DE TISSUS DE CROWN GALL D'*ABUTILON AVICENNAE* GAERTN. — A la suite des résultats peu encourageants fournis par nos premières tentatives de cultures de tissus de Malvacées, nous avons songé à cultiver non plus le tissu normal, mais le tissu tumoral, espérant obtenir ainsi plus facilement des cultures de tissus de ces plantes. Nos essais ont porté sur la Rose trémière (*Althea rosea* Carr), la Guimauve (*Althea officinalis* L.), la Guimauve de Thuringe (*Althea thuringiaca* L.) et l'Abutilon d'Avicenne (*Abutilon avicennae* Gaertn.). Pour cela au printemps, nous avons semé en serre des graines de ces trois espèces. Un mois et demi plus tard, lorsque les plantules avaient atteint la taille d'une dizaine de centimètres, nous leur avons inoculé le parasite en traversant la tige de part en part, à un centimètre environ du sommet, avec une aiguille chargée de bactéries. La culture (souche A.6 de RIKER) était âgée de vingt-quatre heures au moment de l'inoculation et avait été repiquée au préalable pendant quinze jours toutes les quarante-huit heures.

a. Caractères morphologiques et physiologiques. — Nous n'avons obtenu de tumeurs volumineuses qu'avec une seule espèce : l'*Abutilon avicennae* GAERTN. Ces tumeurs se développèrent rapidement sur des plantules au point d'inoculation et au bout de deux mois, elles avaient atteint 1 centimètre à 1,5 cm. de diamètre. Nous les avons alors mises en culture après les avoir stérilisées suivant la technique habituelle. Nous avons utilisé pour cela trois types de milieu; l'un ne contenait pas d'hétéroauxine et les deux autres renfermaient de l'acide naphthyle acétique aux concentrations de  $10^{-7}$  et  $5.10^{-7}$ . La moitié



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Culture de tissus de Crown Gall de Vigne âgée de deux mois provenant d'une souche âgée de six mois (4° repiquage). Elle forme une masse peu mamelonnée de tissus translucides.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Culture de tissus de Crown Gall de *Nicotiana tabacum* âgée d'un mois provenant d'une souche âgée de deux ans (12° repiquage).



environ des cultures furent contaminées par le *Phytomonas tumefaciens* et périrent ; les autres, demeurées aseptiques, ne tardèrent pas à se développer. La surface du fragment se couvrit de petits tubercules brillants qui grossirent rapidement et formèrent en deux mois de volumineux mamelons. Toutes les cultures stériles se sont développées très régulièrement. Nous n'avons pas observé de mortalité, ni d'irrégularité de croissance comme nous en avons rencontré au cours des premiers repiquages des cals qui se forment normalement sur les tiges des autres Malvacées que nous avons étudiées.

Nous n'avons pas étudié de façon systématique l'action de l'acide naphthyle acétique sur ces tissus. Nous avons simplement constaté que la croissance des colonies cultivées en présence de ce produit paraissait identique à celles des cultures qui n'avaient jamais subi son action ; aussi par la suite nous les avons repiquées sans incorporer d'hétéroauxine aux solutions nutritives. Certains explantats renfermaient encore des cellules de *Phytomonas*, car, au cours du second repiquage, nous avons constaté que certaines cultures



FIG. 27. — Vaisseaux aberrants se formant dans une culture de tissus de Crown Gall de *Vitis Vinifera*.

étaient contaminées par ces bactéries (environ 20 p. 100). Mais par la suite, nous n'avons jamais vu réapparaître de *Phytomonas* dans nos cultures. La facilité avec laquelle nous avons pu cultiver les tissus de tumeur d'Abutilon et la croissance homogène de ces cultures contraste avec les difficultés que nous avons rencontrées avec les tissus normaux des autres Malvacées et montrent que la transformation tumorale est avantageuse pour les cultures de tissus. La souche que nous avons isolée est actuellement âgée de trois ans (juin 1948) et a subi 18 repiquages.

*b. Structure anatomique.* — La structure anatomique des cultures de tissus de Crown Gall d'Abutilon est très différente de celle des cultures de tissus de Crown-Gall de Vigne, mais se rapproche beaucoup de celles que GAUTHERET (24) a signalé sur les cultures de tissus de tumeurs de Topinambour et de Soleil. Cet auteur a, en effet, constaté que, dans les colonies tumorales, les cellules ligneuses ne sont plus associées à des éléments libériens et qu'il est impossible d'y déceler des tubes criblés, soit par des examens directs, soit à l'aide du réactif iodo-ioduré qui rend ces éléments très visibles, en colorant en rouge les grains d'amidon spéciaux agités du mouvement brownien qu'ils renferment normalement. Les cultures de tumeurs d'Abutilon sont de ce type. Elles ne renferment pas de formations cribrovasculaires, mais elles sont constituées par un simple parenchyme au sein duquel se différencient de très nombreuses cellules ligneuses disposées absolument au hasard. Ces cultures sont toujours massives, fermes et compactes, et ne pré-

sentent pas l'aspect bombé des cultures de *Malva sylvestris*. Jamais elles ne forment de racines.

III. CULTURES DE TISSUS DE CROWN GALL DE *Nicotiana Tabacum* L. var. « White Burley ». — Devant la difficulté d'obtenir des cultures de tissus normaux de Tabac nous avons songé à cultiver des tissus tumoraux espérant ainsi obtenir de meilleurs résultats. Des tissus de ce type ont en effet été cultivés pour la première fois par WHITE (77) dès 1939. Cet auteur ne s'est d'ailleurs pas adressé à des Crown Gall, mais aux tissus d'un hybride de *Nicotiana Langsdorfii* X *Nicotiana glauca*, qui présente la curieuse propriété de former

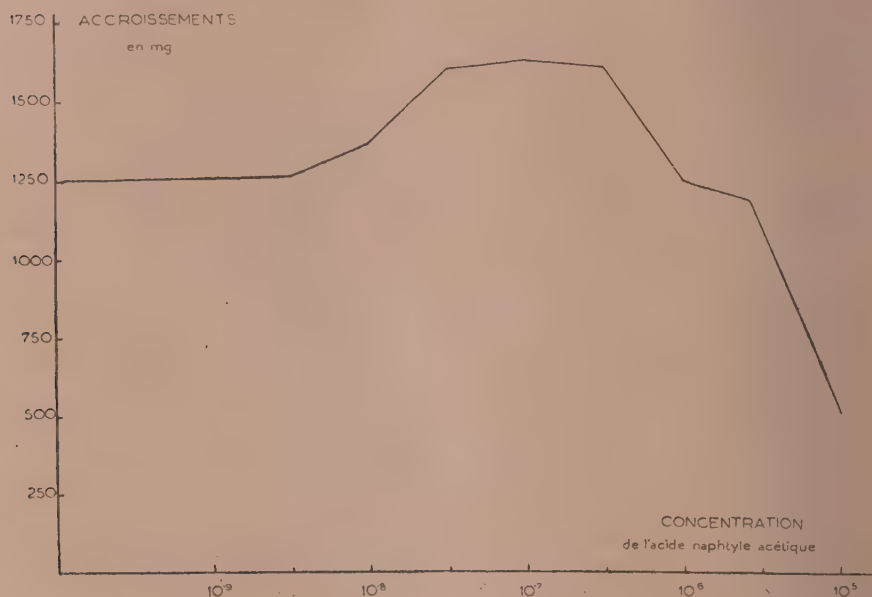


FIG. 28. — Action de l'hétéroauxine sur la croissance des tissus de Crown Gall de *Nicotiana Tabacum*.

Ces tissus prolifèrent intensément en l'absence d'hétéroauxine toutefois ils n'ont pas perdu toute sensibilité vis-à-vis des effets excito-formateurs de ce produit car celui-ci exerce une action stimulante très nette pour les concentrations comprises entre  $5 \cdot 10^{-8}$  et  $5 \cdot 10^{-7}$  des doses plus élevées étant rapidement, toxiques.

spontanément des tumeurs, chaque fois que l'on produit une lésion quelconque sur la tige. Ces tumeurs résultent d'une exagération des processus cicatriciels. Lorsqu'on les ensemence sur des milieux sans hétéroauxine, elles prolifèrent sans peine d'une façon exubérante. Toutefois, cette espèce ne convient pas pour le but que nous proposons pour la culture des Virus, car on n'a pas étudié les réactions de ses tissus vis-à-vis de ces agents pathogènes.

C'est pourquoi nous avons cherché à obtenir des tumeurs du *Nicotiana tabacum* dont les réactions aux différents virus sont bien connues.

a. Caractères morphologiques et physiologiques. — Pour obtenir ces cultures, nous avons opéré de la même façon que sur l'*Abutilon avicennae*, c'est-à-dire que nous avons

piqué avec une aiguille souillée de *Phytomonas tumefaciens*, la tige ou le pétiole de jeunes plantes de tabac cultivées en serre. Nous avons utilisé pour cela, outre la souche A.6 de RIKER, la souche «Anthemis» provenant de l'Institut Pasteur. Les tumeurs se sont développées rapidement aux points d'inoculation et au bout de deux mois elles avaient atteint une dimension suffisante pour être mises en culture. Après les avoir stérilisées suivant la technique habituelle, nous avons ensemencé des fragments à la surface de milieux gélosés ne contenant pas d'hétéroauxine. Nous avons été surpris de constater que peu de cultures (un quart environ) étaient infectées par le *Phytomonas*; les autres se développaient avec une très grande rapidité et en un mois et demi formaient d'énormes cals qui venaient s'écraser contre les parois du tube. Nous avons repiqué ces colonies pendant deux ans sur des milieux dépourvus d'hétéroauxine et elles ont continué à proliférer avec la même vigueur (pl. XIX, fig. B). Les tissus de Crown-Gall de Tabac paraissent donc capables de proliférer indéfiniment *in vitro* en l'absence de toute substance de croissance. Nous avons cependant cherché à savoir s'ils avaient réellement perdu toute sensibilité vis-à-vis du pouvoir excitoformateur de l'hétéroauxine et pour cela nous les avons repiqués sur des milieux dont la concentration variait de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  ainsi que sur des solutions témoins qui n'en contenaient pas. Des pesées de cultures faites deux mois plus tard nous ont montré que jusqu'à la concentration de  $10^{-8}$ , ce produit était sans action. Par contre, pour des concentrations comprises entre  $5.10^{-8}$  et  $5.10^{-7}$ , il active notablement la croissance des tissus de tumeurs, car les accroissements moyens des cultures sont supérieurs d'environ 300 mg. à ceux des témoins (fig. 28). Des doses plus élevées deviennent rapidement toxiques.

Ainsi, bien que les tissus de tumeur de Tabac soient susceptibles de proliférer indéfiniment, sans facteur de croissance, ils n'ont pas perdu toute sensibilité vis-à-vis de l'action excitoformative de l'hétéroauxine. Ils ne sont donc pas entièrement comparables à certains tissus accoutumés comme ceux de Vigne ou de Vigne-vierge où cette action est impossible à déceler. Par leur aspect extérieur ces cultures sont tout à fait semblables aux cultures de tissus accoutumés de Tabac, au point qu'il est impossible de les distinguer les unes des autres. Comme ces derniers, elles forment d'abondantes masses de parenchyme, régulièrement mamelonnées. Certaines produisent parfois des ébauches de bourgeons qui n'évoluent pas en tiges feuillées et cessent très tôt de se développer, mais n'émettent jamais de racines. La souche que nous avons isolée est âgée de deux ans et a subi 12 repiquages.

b. Structure anatomique. — L'examen superficiel de coupes pratiquées dans des colonies tumorales et dans des tissus accoutumés ne permet de déceler aucune différence de structure. Toutes deux sont formées d'un parenchyme renfermant de nombreux îlots de cellules ligneuses. Toutefois un examen plus attentif permet de voir que dans les tissus accoutumés les cellules ligneuses sont entourées d'éléments libériens et forment des nodules cribrovasculaires, alors que dans les cultures tumorales les vaisseaux ne sont pas associés à des éléments criblés. Leur structure est donc en tous points comparable à celle des cultures de tumeurs d'Abutilon.

Ces expériences montrent que, tandis qu'on éprouve la plus grande difficulté à cultiver les tissus normaux de Tabac, les tissus de Crown-Gall de cette espèce prolifèrent *in vitro*, avec la plus grande facilité. Cette transformation tumorale paraît donc avantageuse pour la culture des tissus de cette plante.

## CHAPITRE IV.

CULTURES ASSOCIÉES DE TISSUS VÉGÉTAUX  
ET DE PARASITES OBLIGATOIRES.

L'impossibilité de cultiver *in vitro* les parasites obligatoires rend difficile la tâche des pathologistes qui se consacrent à leur étude. Ils sont obligés en effet de se contenter de tirer parti des infections naturelles et, lorsqu'elles se sont manifestées, d'essayer de les propager sur des individus cultivés en serre. L'étude de ces parasites obligatoires n'est donc généralement possible que pendant la période de végétation de la plante-hôte et l'on ne peut se livrer à aucune recherche vraiment rigoureuse, car il est, en outre, difficile de maintenir des plantes entières dans des conditions constantes et bien déterminées de température, d'humidité et d'éclairement. Les plantes cultivées ne sont d'autre part jamais entièrement homogènes et leurs réactions vis-à-vis de la maladie varient suivant l'âge et les individus. Enfin, il est très délicat de cultiver une plante entière dans des conditions d'aseptic rigoureuse et, si ces conditions ne peuvent être obtenues, on n'est pas assuré d'être à l'abri de contaminations accidentelles. Cet inconvénient est particulièrement grave lorsqu'on étudie les virus, car le mélange de plusieurs souches provoque souvent chez la plante des symptômes très différents de ceux obtenus pour un seul agent pathogène. De plus, si les deux virus possèdent des propriétés voisines, il devient presque impossible de les séparer et de les isoler à nouveau. Afin d'éviter les difficultés rencontrées en expérimentant sur des plantes entières, on a essayé de cultiver les parasites obligatoires sur des feuilles détachées et conservées au laboratoire sur des solutions minérales additionnées de sucre (83). Ces organes ne peuvent ni proliférer, ni se multiplier et ne peuvent donc survivre que pendant quelques mois. Cette méthode rudimentaire a toutefois permis à un grand nombre d'expérimentateurs de cultiver au laboratoire des Péronosporacées, des Urédinées et même des virus. Grâce à elle, on a étudié la résistance variétale des plantes parasitées et l'immunité acquise. On a précisé l'effet des vitamines et de la nutrition hydrocarbonée sur l'infection; on a également analysé l'hétérothallisme éventuel des champignons parasites, leur reproduction et leur action sur la physiologie de l'hôte.

Mais les imperfections dont nous venons de parler ont limité cependant l'utilisation de cette méthode; c'est pourquoi nous avons cherché à perfectionner la culture de ces parasites obligatoires en les faisant croître non plus sur des plantes entières, ou des organes détachés, mais sur des cultures de tissus de l'hôte qu'ils parasitent normalement. Les premières cultures associées que nous ayons réalisées sont celles du Mildiou de la Vigne (48). Nous avons ensuite étudié de la même manière l'Oïdium de la Vigne, et nous avons tenté d'utiliser cette méthode pour cultiver diverses Urédinées : *Kuehneola albida* (KUHN.) MAGN. et *Phagnidium violaceum* (SCHUTZ), parasites des Ronces, *Gymnosporangium clavariiforme* (JACO.) REES., qui attaque l'Aubépine, *Puccinia Malvacearum* MONT. qui se développe sur les Malvacées. Nous avons enfin réalisé la culture de divers virus, virus de la Mosaïque du Tabac, virus X et virus Y de la Pomme de terre.

### A. Culture du Mildiou de la Vigne.

Nous examinerons successivement les caractères généraux du Mildiou de la Vigne, puis l'isolement aseptique du champignon, l'infection des cultures, leur repiquage, leur structure anatomique et le développement du parasite sur les tissus de diverses espèces et enfin nos tentatives de cultures sur des milieux inertes.

I. CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU *PLASMOPARA VITICOLA* (BERK. et CURT.) BERL. et DE TONI. — Nous décrirons les caractères généraux du Mildiou en insistant sur ceux dont la connaissance est utile pour la mise au point de la culture *in vitro*. Le *Plasmopara viticola* est un champignon oomycète de la famille des Péronosporacées. Il possède un mycélium non cloisonné, très ramifié, qui se développe entre les cellules des parenchymes. Il perfore les cloisons cellulaires à l'aide de diverticules spéciaux ou suçoirs qui pénètrent à l'intérieur des cellules où ils puisent des matières nutritives. Lorsque le mycélium a accumulé suffisamment de produits de réserve et que les conditions atmosphériques sont favorables, il émet à l'extérieur des tissus contaminés, des organes de dissémination qui se présentent sous la forme d'arbuscules ramifiés appelés sporangiophores; ceux-ci forment à l'extrémité de leurs ramifications des sporanges ovoïdes. Ces sporanges se détachent très facilement et sont susceptibles de germer au contact de l'eau en produisant chacun plusieurs zoospores. D'après RAVAZ (62) cette opération demande une heure un quart à la température de 15°. Chaque zoospore est munie de deux flagelles qui lui permet de se mouvoir dans l'eau. Elles nagent quelque temps puis se fixent, perdent leurs flagelles et germent en donnant naissance à un tube germinatif. Si la gouttelette d'eau au sein de laquelle les zoospores ont été libérées est sur un organe non aoûté (feuille, jeune sarment, grain de raisin avant la veraison) le tube germinatif pénètre dans les tissus qu'il gagne à la faveur de l'orifice d'un stomate, et le mycélium intercellulaire se développe d'abord sans manifester sa présence par des lésions visibles. On donne le nom d'incubation à cette période de développement invisible dont la durée varie de cinq à vingt-six jours suivant la température et l'âge des organes atteints (62). La fin de l'incubation est marquée par l'apparition d'un feutrage de sporangiophores sur les organes atteints : à condition toutefois que l'état hygrométrique soit assez élevé. Lorsque l'air est trop sec, le mycélium ne produit pas de sporangiophores mais évolue entièrement à l'intérieur des tissus. Sur les feuilles, il manifeste sa présence par un jaunissement de la partie envahie qui devient en outre translucide. On donne à ces parties contaminées le nom de « taches d'huile » en raison de leur aspect gras.

Ce mode de propagation de la maladie par sporanges ne s'observe que pendant la belle saison. En automne, lorsque les conditions sont devenues défavorables, des organes sexués apparaissent. Il se forme des oospores qui demeurent en repos pendant tout l'hiver dans les feuilles mortes. Au printemps suivant, ces oospores germent pour donner chacune un sporange spécial beaucoup plus volumineux que les sporanges d'été auxquels on donne improprement le nom de macroconidie. Au contact de l'eau, chaque sporange libère des zoospores, qui propagent la maladie par simple voie asexuée.

II. ISOLEMENT ASEPTIQUE DU CHAMPIGNON. — La première condition à réaliser pour obtenir des cultures de Mildiou est l'isolement aseptique du champignon. Pour y parvenir voici comment nous opérons. On détache des feuilles de Vigne attaquées présentant les lésions caractéristiques du type « tache d'huile » et on les stérilise de la manière sui-

vante : on les plonge très rapidement dans de l'alcool à 95°, puis on les immerge durant dix minutes dans une solution à 70 gr. par litre d'hypochlorite de calcium à 200° chlorométrique; les feuilles sont ensuite rincées à l'eau stérile et placées dans des boîtes de Petri également stérilisées entre deux feuilles de papier filtre mouillé. Après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 20°, les « taches d'huile » se recouvrent d'un épais feutrage de sporangiophores sur lesquels on peut aisément prélever aseptiquement des sporanges.

Cette méthode n'est pas toujours applicable car le phénomène des « taches d'huile », qui permet à coup sûr de reconnaître une invasion sur le point de fournir des sporanges, n'est pas très fréquent. Nous avons donc dans certains cas dû nous servir de feuilles portant de jeunes sporangiophores. Ces feuilles sont stérilisées par la méthode précédente, puis placées à l'étuve dans les mêmes conditions. Ce traitement détruit les sporanges, mais le mycélium interne en reforme s'il n'est pas trop âgé. De telles feuilles sont plus difficiles à stériliser et fournissent moins de sporanges. C'est pourquoi il faut leur préférer des feuilles portant des « taches d'huile ».

Signalons enfin que nous avons pu, à plusieurs reprises, isoler le Mildiou à partir de rameaux attaqués en les stérilisant à l'hypochlorite et en les repiquant après les avoir épluchés, sur des milieux gélosés préparés pour la culture des tissus de Vigne; huit à dix jours après l'ensemencement, ces tronçons de sarments se sont couverts de sporangiophores.

III. INOCULATION DES CULTURES. — Pour réaliser la contamination des cultures de tissus, nous avons tout d'abord découpé des parties de feuille couvertes de sporanges en petits fragments que nous portions sur les tissus. L'expérience nous a montré que cette technique était mauvaise, car ces fragments de feuilles, étant très sensibles au parasite, mouraient très vite si bien que l'infection réussissait rarement. D'autre part, quelles que soient les précautions que l'on prend pour stériliser ces organes, on n'est jamais certain de leur asepsie. Nous avons alors cherché à réaliser l'infection à partir des sporanges eux-mêmes; pour cela, on pouvait opérer de deux façons : on pouvait, soit séparer les sporanges des feuilles, les laisser pendant une heure et demie dans de l'eau stérile pour qu'ils libèrent leurs zoospores, et placer ensuite une goutte de cette eau chargée de zoospores au contact des tissus, ou bien placer d'abord une goutte d'eau sur les tissus et y porter ensuite quelques sporanges. Nous avons utilisé comparativement les deux méthodes.

Pour détacher les sporanges de la feuille, nous utilisons une pipette Pasteur très effilée et cassée à son extrémité afin que ses bords soient tranchants. Nous déposons un peu d'eau stérile sur une partie de feuille garnie de sporanges, et nous promenons lentement le bord coupant de la pipette à la surface de la feuille, afin d'en détacher ces organes. Il ne reste plus qu'à aspirer la goutte d'eau chargée de sporanges et à la faire couler dans un tube à essais stérile. On parvient aisément de cette façon à obtenir des suspensions qui renferment plus de 250.000 sporanges au centimètre cube. Une heure et demie plus tard, lorsque les sporanges ont libéré les zoospores, on fait tomber à l'aide d'une autre pipette très effilée une goutte de cette suspension à la surface d'une culture de tissus de Vigne; pour éviter que cette goutte ne roule sur la surface du tissu sous l'effet de la tension superficielle et ne se détache, il est souvent utile de préparer avec un scalpel une petite encoche à la surface des tissus. On réalise ces opérations sans retirer la colonie tissulaire du tube où elle s'est développée afin d'éviter les contaminations accidentelles.

Cette méthode, très simple, ne donne de bons résultats que lorsque les feuilles de



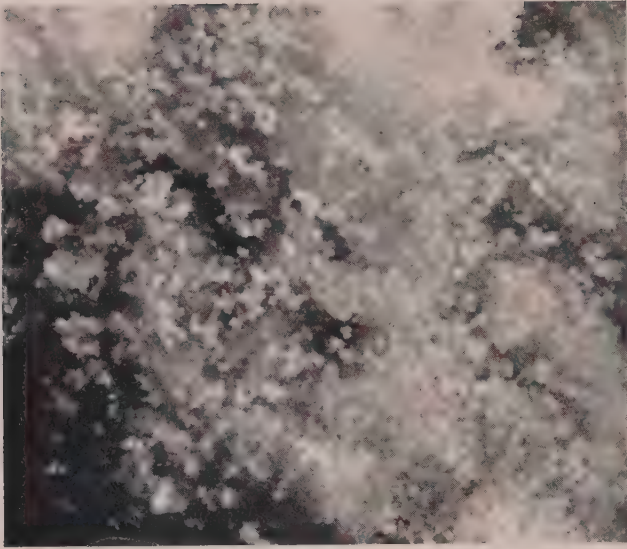
J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Aspect d'un cal de Vigne envahi par le *Plasmopara viticola*. Les bouquets de sporanges apparaissent comme de fines granulations blanches recouvrant tout le fragment de tissu.



J. VINCENT, phot.

FIG. B. — Mildiou se développant sur une racine de Vigne.



J. VINCENT, phot.

FIG. A. — Mildiou se développant sur une culture de tissus de Vigne.  
Les amas incolores que l'on distingue en surface sont les sporanges du champignon.



J. VINCENT, phot.

FIG. B — Crown Gall provoqué sur une racine de *Hyoscyamus niger*  
par l'inoculation de *Phytomonas tumefaciens*.

Vigne ont été stérilisées de façon parfaite. Une seule feuille mal désinfectée suffit pour contaminer toutes les cultures. C'est pourquoi nous préférons une autre méthode consistant à déposer une goutte d'eau stérile à la surface de chaque culture et à y transporter quelques sporanges prélevées directement sur une feuille de Vigne. Dans les deux cas, après avoir bouché le tube de culture avec un tampon de coton, il convient de l'obturer avec une feuille de papier d'étain afin que l'atmosphère demeure saturée de vapeur d'eau.

Les zoospores nagent pendant quelque temps dans la goutte d'eau, puis se fixent à la surface de l'explantat et émettent un tube germinatif qui pénètre aisément à l'intérieur. Comme dans le cas d'infections naturelles de feuilles, le parasite manifeste sa présence après une certaine période d'incubation par l'émission de sporanges, mais tandis que dans le cas d'inoculation de feuilles entières la durée d'incubation de la maladie paraît uniquement réglée par la température et durant tout l'été ne dure guère plus de cinq à six jours, elle est beaucoup plus lente et moins régulière lorsqu'on infecte des cals primitifs formés *in vitro* sur des tronçons de tige. Les premiers sporanges n'apparaissent jamais avant une dizaine de jours et il arrive que l'infection demeure latente à l'intérieur de certaines cultures pendant plus d'un mois, sans que l'on puisse déceler la cause de ce retard. Les variations de température ne peuvent être invoquées en ce cas, puisque les cultures sont maintenues à température constante.

IV. INVASION DES CULTURES ET MODE DE DÉVELOPPEMENT DU MILDIOU. — Nous avons étudié le mode de développement du Mildiou sur les tissus cultivés *in vitro*.

Le développement des sporangiophores débute toujours au point d'infection, c'est-à-dire à l'emplacement où avait été déposée la goutte d'eau chargée de zoospores; toutefois l'infection ne demeure pas localisée à cet endroit, mais elle s'étend peu à peu à toute la surface des tissus (pl. XX, fig. A). Cette progression est très lente et il faut environ un mois à un mois et demi pour qu'elle soit complète sur un cal primitif produit par un fragment de tige; les tissus préexistants du sarment sont également attaqués, ainsi que les racines lorsqu'il s'en est formé (pl. XX, fig. B).

Lorsqu'on inocule de cette façon des colonies anciennes ayant déjà été repiquées plusieurs fois, la période d'incubation est encore plus longue et plus irrégulière. Ces colonies sont d'ailleurs moins sensibles au Mildiou que les cals primitifs. Cette résistance se manifeste tout d'abord par une plus grande difficulté d'infection. En effet, la proportion des cultures infectées est toujours plus élevée lorsque l'on effectue cette opération sur des cals primitifs (60 à 75 p. 100) que si on inocule des cultures provenant d'une souche ancienne (30 à 40 p. 100). En outre, sur ces dernières, le feutrage des sporangiophores est moins dense (pl. XXI, fig. A) et l'examen microscopique révèle que ces organes sont moins grands et moins ramifiés. Enfin, les colonies repiquées résistent mieux au parasite que les tissus des cals primitifs qui sont entièrement tués par le parasite au bout d'un mois et demi environ; ceux de cultures ayant subi plusieurs repiquages demeurent vivants très longtemps. Les tissus ayant subi le phénomène d'accoutumance à l'hétéroauxine sont attaqués de la même manière que les tissus normaux.

Si on pratique une coupe dans un cal envahi par le Mildiou (fig. 29), on constate la présence d'un mycélium formé de filaments épais de 8 à 10  $\mu$ , très réfringents et très ramifiés qui s'insinuent entre les cellules parenchymateuses en progressant à travers les méats. Ce mycélium produit de nombreux suçoirs irrégulièrement disposés qui perforent les parois cellulaires. Ces suçoirs ont la forme de renflement sphériques ou

piriformes qui font saillie au travers de la paroi de la cellule. Ils sont absolument comparables à ceux que forme le champignon à l'intérieur des organes normaux de la Vigne. La colonie n'étant pas limitée par une cuticule, le mycélium peut émettre des hyphes qui se répandent à l'extérieur. Ces hyphes se développent à l'air libre dans l'atmosphère saturée du tube et peuvent atteindre une longueur de  $500\ \mu$ , mais il ne s'en forme jamais à l'intérieur du milieu de culture. Ces formations sont spéciales aux cultures, on ne les observe jamais sur les plantes entières.

Les sporangiophores naissent exclusivement sur le mycélium interne et, en aucun cas,



FIG. 29. — Coupe d'une culture de tissus de *Vitis vinifera* attaquée par le *Plasmopara viticola*.

le mycélium aérien n'en produit. Ils sortent par groupe de 3 ou 4 en s'insinuant entre les cellules et viennent s'épanouir à l'air libre. Leurs formes et leurs dimensions sont assez variables. Ceux produits par des cultures réalisées sur des cals primitifs peuvent atteindre  $1.000\ \mu$  de long et sont très ramifiés, tandis que ceux qui apparaissent sur des cultures ayant subi plusieurs repiquages ne dépassent pas  $250\ \mu$  et sont peu ramifiés.

Nous n'avons jamais observé en culture la formation d'organes sexuels ni d'oospores.

V. REPIQUAGE DU MILDIOU. — Nous avons vu que, après une période d'un mois et demi, quand le parasite a gagné toute la culture, les tissus ne tardent pas à mourir. Pour maintenir le champignon vivant, il faut alors le repiquer. Pour cela, nous procédons de

la manière suivante : on dépose, à l'aide d'une pipette Pasteur très effilée, une goutte d'eau stérile à la surface de chacune des colonies destinées à recevoir le parasite, puis on extrait de son tube un fragment de tissu attaqué et on le place dans une boîte de Petri; en se servant d'un scalpel, on détache alors de la surface de ce dernier de minces lamelles de tissus recouverts de conidiophores. Ces lamelles sont réduites en petits fragments d'un millimètre de côté que l'on transporte avec des pinces dans la goutte d'eau déposée à la surface de la culture vierge. Cette façon d'opérer, légèrement différente de celle que nous utilisons pour le prélèvement initial du parasite, donne des résultats plus réguliers, car le fragment découpé demeure vivant pendant un certain temps et le mycelium qu'il renferme continue à produire de nouveaux sporanges pendant plusieurs jours. Nous avons pu, de cette façon, entretenir pendant trois ans des cultures associées de *Plasmopara* et de tissus de Vigne.

Il est possible de repiquer directement des tissus provenant d'une souche ancienne et parasités par le Mildiou. Nous avons signalé que, dans ce cas, le parasite se développe très lentement et ne les tue pas immédiatement, si bien qu'ils continuent à proliférer. Toutefois, leur croissance est très ralentie et ils finissent généralement par périr après deux passages.

VI. DÉVELOPPEMENT DU MILDIOU SUR LES TISSUS DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE VIGNES. — Aucune espèce de Vigne n'est normalement à l'abri du Mildiou. Ce parasite peut être rencontré même sur des Vignes-vierges telles que les *Parthenocissus tricuspidata* et *quinquefolia* (62). Cependant, ces dernières, ainsi que certaines espèces de Vigne, comme *Vitis riparia* et *Vitis rupestris*, ne sont que rarement atteintes et le *Plasmopara* ne leur cause que des dégâts minimes qui consistent en des taches foliaires rares et peu étendues. D'autres, telles que *V. Berlandieri* ou *V. labrusca*, bien que portant sur leur feuillage des altérations plus étendues subissent, elles aussi, peu de dommage. Enfin, d'autres espèces comme *V. arizonica* sont aussi sensibles que *V. vinifera*.

Dans le but de rechercher si cette immunité relative se manifeste *in vitro*, nous avons réalisé des cultures de tissus de diverses espèces et variétés de *Vitis* et de *Parthenocissus*, et nous avons essayé d'obtenir leur infection par le Mildiou.

La première souche de tissus de *Vitis vinifera* que nous avons isolée appartient à la variété « Aramon ». C'est sur cette souche que nous avons réalisé la plupart des expériences que nous venons de décrire. Nous avons ensuite réalisé des cultures de deux cépages de la même espèce : « Chasselas de Fontainebleau » et « Carignan ». Le développement du Mildiou sur ces deux variétés a été comparable à celui observé sur l'« Aramon ».

Parmi les tissus d'espèces exotiques, ce sont ceux de *Vitis arizonica* qui se sont montrés les plus sensibles au Mildiou. L'infection s'y est propagée de la même manière que sur les tissus de *Vitis vinifera*. Nous avons également pu obtenir des cultures de Mildiou sur les tissus de *Vitis Davidii*, et sur ceux de la variété « Noah » que l'on suppose être un hybride de *V. riparia* et *V. labrusca*.

Lorsqu'on essaye d'inoculer le Mildiou à des cals de *V. Davidii* en déposant à la surface de ceux-ci un bouquet de sporangiophores dans une goutte d'eau, on constate que la proportion de culture infectée est très faible (15 à 20 p. 100). En outre, le parasite ne paraît pas gagner l'ensemble du cal comme cela se produit chez les Vignes européennes, mais demeure limité au voisinage du point d'infection. Enfin, les conidiophores ne forment pas un feutrage dense et serré mais se présentent sous forme de petits groupes isolés les uns des autres. Enfin, les tissus parasités réagissent en élaborant une grande quantité d'anthocyane.

La variété « Noah » paraît plus résistante encore. Il est très difficile d'obtenir le développement du *Plasmopara* sur ses tissus. Lorsqu'on y parvient, le champignon manifeste sa présence par quelques rares bouquets de sporangiophores localisés dans la région qui avait subi le contact direct des zoosporanges inoculés. Ces sporangiophores sont toujours beaucoup plus petits et moins ramifiés que ceux que l'on observe sur les tissus des cépages européens.

Signalons enfin qu'il nous a été impossible d'inoculer le Mildiou aux tissus des autres espèces de Vigne que nous avons étudiées : *Vitis vulpina*, *V. rupestris*, *V. riparia*, *V. Coignetiae*, ainsi qu'aux *Parthenocissus tricuspidata* et *quinquefolia*. Ces différentes espèces sont cependant parfois attaquées dans les conditions normales.

Ces expériences paraissent montrer qu'il y a une relation entre la sensibilité naturelle et celle des tissus cultivés *in vitro*, car les tissus les plus faciles à inoculer *in vitro* sont ceux des espèces les plus facilement attaquées dans la nature. Toutefois elles indiquent que les tissus peu différenciés que l'on cultive *in vitro* constituent un milieu beaucoup moins favorable pour le Mildiou que le parenchyme des feuilles où il se développe ordinairement.

VII. TENTATIVES DE CULTURES SUR DES MILIEUX INERTES. — On peut se demander s'il est possible de fournir au Mildiou sous forme d'un milieu inerte les substances nutritives qu'il puise dans les cellules de la Vigne par l'intermédiaire des sucoirs. Dans le but de tenter de résoudre cette question, nous avons essayé de cultiver le champignon dans divers substrats naturels ou artificiels.

1° *Milieux naturels*. — Les premiers milieux que nous avons essayés étaient préparés de la manière suivante : des feuilles et des jeunes sarments d'un cépage sensible à la maladie comme l'« Aramon » étaient finement hachés et la bouillie ainsi obtenue était filtrée sur une étamine ; le jus trouble était alors clarifié par centrifugation et stérilisé au moyen de filtre du Kitasato. Ce jus stérile était soit dilué de moitié, par une solution stérile de gélose à 1,5 p. 100, refroidie vers 40°, soit mélangé aseptiquement avec le résidu de broyage des feuilles au préalable stérilisé à l'autoclave. Ces milieux se sont révélés impropres à la culture du champignon. Nous n'avons jamais observé la moindre prolifération.

Nous avons alors supposé qu'au cours du broyage des feuilles certaines substances nécessaires à la naissance du *Plasmopara* pouvaient s'altérer et se détruire et nous avons cherché à tuer les tissus de Vigne d'une manière moins brutale en employant soit la chaleur modérée, soit l'asphyxie. La première méthode a été mise en œuvre en plaçant des colonies tissulaires pendant vingt-quatre heures dans une étuve réglée à 50°. Toutes les cultures ainsi traitées ont rapidement changé d'aspect. Elles ont bruni et ont produit une substance noirâtre qui a diffusé dans la gélose. Nous les avons inoculées immédiatement après le traitement, avant que leur aspect commence à se modifier, à l'aide de fragments d'une culture portant des sporanges, mais, en aucun cas, le parasite ne s'est développé.

Dans une autre série d'expériences, nous avons tué les tissus par asphyxie, en scellant au chalumeau des tubes contenant des colonies de tissus de Vigne. Celles-ci sont demeurées en atmosphère confinée pendant un an. Les tissus ne paraissaient pas sensiblement altérés. Cependant, ils étaient devenus incapables de proliférer à nouveau, car, repiqués sur un milieu neuf, ils n'ont pas tardé à brunir au contact de l'air. Nous avons inoculé des fragments de tissus portant des conidiophores à ces cultures, mais nous n'avons observé aucun développement.

2° *Milieux synthétiques*. — Imaginant alors que les cellules mortes produisaient une substance toxique pour le champignon, nous avons tenté sa culture en milieu synthétique. Pour cela, nous avons utilisé les solutions nutritives employées par SCHOFFER (66) et par KÖGL (36)<sup>(1)</sup>, au cours de leurs recherches de l'action des vitamines sur les champignons; nous avons ajouté à ces solutions diverses substances de croissance qui ont été reconnues nécessaires au développement de certains microorganismes. Nous avons ainsi incorporé à ces solutions de l'aneurine à la concentration de  $10^{-7}$ , de l'acide nicotinique à  $10^{-6}$ , de la pyridoxine à  $10^{-7}$ , de la biotine à  $10^{-8}$ , de l'acide *D*-pantothénique à  $10^{-6}$ , du meso-inositol à  $10^{-4}$  et de l'adénine à  $10^{-7}$ . En outre, d'autres milieux nutritifs ont reçu divers aminoacides : glycolle, cystéine, tryptophane,  $\beta$ -alanine, acide glutamique, à la concentration de  $10^{-5}$ .

Ces solutions étaient solidifiées par l'adjonction de 1,2 p. 100 de gélose et stérilisées à l'autoclave à  $110^{\circ}$  pendant vingt minutes. Nous ensemencions ensuite en surface de petits fragments de cultures encore vivantes et recouvertes de sporanges de Mildiou. Mais, dans aucun cas, nous n'avons pu observer le développement du parasite sur ces milieux synthétiques.

## B. Culture de l'Oïdium de la Vigne.

I. CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE L'OÏDIUM. — L'Oïdium de la Vigne : *Uncinula necator* (Schw). BURR., appartient à la famille des Erysiphacées dont toutes les espèces sont des parasites obligatoires des végétaux supérieurs. L'*Uncinula necator* se développe sur toutes les espèces *Vitis* et sur quelques *Parthenocissus*. Son mycélium ne pénètre pas à l'intérieur des tissus comme celui du Mildiou, mais il est en grande partie aérien et forme un léger feutrage incolore à la surface des organes. Il envoie à l'intérieur des cellules épidermiques des suçoirs globuleux ou ovoïdes à l'aide desquels il puise les substances nécessaires à son développement. Il produit également des hyphes perpendiculaires à la surface des organes; ces hyphes composées de plusieurs cellules sont en réalité des conidiophores dont les cellules extrêmes s'élargissent peu à peu et se transforment en conidies qui se détachent facilement et disséminent ainsi la maladie. Ces conidies peuvent germer sur les organes de la Vigne en atmosphère très humide et propagent le champignon par voie végétative. Le parasite hiberne sous forme mycélienne dans les bourgeons de la Vigne et peut ainsi s'y maintenir indéfiniment sans former de périthèces. Les conidies germent rapidement dans l'eau quand la température est voisine de  $20^{\circ}$ . Il suffit d'en placer quelques-unes entre lame et lamelle pour constater, en examinant la préparation après quatre ou cinq heures, que la plupart ont déjà émis un filament germinatif. Ce filament doit produire très tôt des suçoirs car, en conservant en chambre humide des préparations

### (1) Solution nutritive de SCHOFFER :

|                                            |                       |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| H <sup>2</sup> O.....                      | 1.000 cm <sup>3</sup> |
| Glucose.....                               | 1 gr.                 |
| Asparagine.....                            | 1 gr.                 |
| SO <sup>4</sup> Mg, 7H <sup>2</sup> O..... | 0,5 gr.               |
| PO <sup>4</sup> KH <sup>3</sup> .....      | 1,5 gr.               |

### (2) Solution de KÖGL :

|                                            |                       |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| H <sup>2</sup> O.....                      | 1.000 cm <sup>3</sup> |
| Tartrate d'Ammonium.....                   | 5 gr.                 |
| NO <sup>3</sup> NH <sup>4</sup> .....      | 1 gr.                 |
| PO <sup>4</sup> KH <sup>3</sup> .....      | 1 gr.                 |
| SO <sup>4</sup> Mg, 7H <sup>2</sup> O..... | 0,5 gr.               |
| NaCl.....                                  | 0,1 gr.               |
| CaCl <sup>2</sup> .....                    | 0,01 gr.              |

de conidies dans l'eau, on constate qu'après vingt-quatre heures il s'est déjà formé sur le tube germinatif des appressoria analogues à ceux d'où naissent les suçoirs.

2. **ISOLEMENT ASEPTIQUE ET INOCULATION DU CHAMPIGNON AUX CULTURES DE TISSUS.** — Étant donné que le mycélium de l'Oïdium se développe à l'extérieur des tissus, on doit donc se contenter de prélever directement les conidies sur de jeunes taches venant d'apparaître sur des feuilles sans les stériliser au préalable. Pour cela, on opère le prélèvement d'une manière analogue à celle utilisée pour le Mildiou en se servant d'une pipette Pasteur très effilée, et cassée irrégulièrement, afin que ses bords soient tranchants; il suffit d'humecter cette pipette en la trempant dans l'eau stérile et de la passer légèrement à la surface de la région contaminée pour détacher de nombreuses conidies qui viennent se coller contre ses parois. On passe ensuite la pipette ainsi chargée de conidies sur une goutte d'eau préalablement déposée à la surface d'une culture de tissus de Vigne. Étant

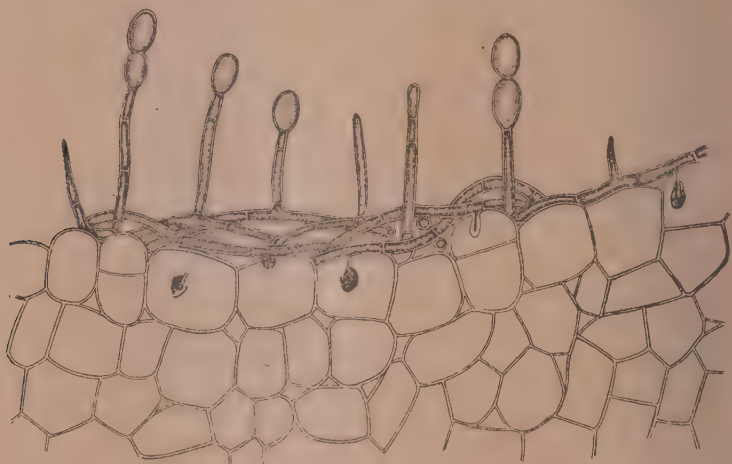


FIG. 30. — Coupe d'une culture de tissus de *Vitis vinifera* attaquée par *Uncinula necator*.

donné que les conidies de l'Oïdium germent aisément dans l'air humide, il n'est pas nécessaire, en principe, que les conidies flottent dans l'eau comme c'est le cas pour les sporanges de Mildiou. Néanmoins, nous avons obtenu de meilleurs résultats en mouillant au préalable la surface des tissus. Cette méthode qui consiste à prélever directement des spores sur des feuilles non désinfectées introduit fréquemment des germes de champignons et de bactéries banales qui pullulent à la surface de la feuille. Il faut donc faire un très grand nombre d'inoculations pour en obtenir qui ne soient pas contaminées.

3. **DÉVELOPPEMENT DU CHAMPIGNON.** -- Bien que les conidies germent en quelques heures dans l'eau à 20°, le mycélium n'apparaît pas sur les cultures inoculées avant une dizaine de jours; il forme tout d'abord un feutrage très discret qui s'épaissit peu à peu et gagne en quelques semaines tout le cal. Les tissus s'altèrent rapidement et l'on observe une nécrose d'abord superficielle, puis, au bout de quarante-cinq à soixante jours, cette altération s'étend à toute la masse de la colonie.

Si on examine une coupe pratiquée dans des tissus attaqués (fig. 30) on constate que le parenchyme est recouvert d'un lavis formé d'hyphes qui s'entrecroisent; sur ce mycélium, naissent de nombreux conidiophores courts et composés de 3 à 4 cellules,

dont l'extrémité s'élargit pour former les conidies; le mycélium émet enfin des suçoirs qui s'enfoncent uniquement dans la rangée la plus externe des cellules de la colonie.

4. REPIQUAGES. — Lorsque les tissus commencent à se nécroser sous l'influence du parasite, c'est-à-dire deux mois après l'inoculation, il convient de procéder au repiquage des cultures. Pour cela, nous utilisons la même technique que pour le Mildiou de la Vigne, c'est-à-dire qu'après avoir placé les tissus infectés dans une boîte de Petri stérile, nous isolons de sa surface de minces fragments d'environ 1 millimètre de côté. Ces fragments sont ensuite déposés à la surface de tissus fraîchement repiqués et préalablement humectés d'eau stérile : la face recouverte par le mycélium doit être en contact avec la colonie. Le résultat de ces repiquages est assez irrégulier. Parfois, les inoculations sont presque toutes réussies, mais d'autres fois, au contraire, l'infection n'est obtenue que dans une faible proportion, sans que l'on puisse déterminer la raison des échecs. En suivant le développement du champignon, nous avons remarqué qu'une humidité excessive nuit à sa prolifération. Ceci nous a conduit à nous abstenir de capuchonner les tubes avec du papier d'étain, qui entretient un état hygrométrique trop élevé. Mais cette absence de capuchonnage présente un inconvénient, car les tissus de Vigne s'accroissent assez peu, en raison du faible état hygrométrique de l'atmosphère, tandis que le parasite se développe plus rapidement, ce qui réduit la durée de la vie des cultures et oblige à des repiquages plus fréquents.

#### C. Tentatives de cultures d'Urédinées.

Les Urédinées forment un immense groupe de champignons étroitement adaptés à la vie parasitaire; aucun d'eux n'est susceptible de mener une vie saprophytique. Ils présentent en outre une spécificité très étroite; chacun d'eux n'infecte, en effet, qu'un petit nombre d'hôtes appartenant à un seul genre ou même à une seule espèce. Quelques-unes cependant peuvent infecter les plantes d'une famille entière. De nombreuses Urédinées sont hétéroïques, c'est-à-dire que leur gamétophyte et leur sporophyte évoluent sur deux espèces distinctes dont la position systématique peut être très éloignée. On conçoit donc que leur culture présente un très grand intérêt, c'est pourquoi nous nous sommes efforcé d'obtenir leur développement *in vitro*. Nous avons pensé que ce problème serait facilité en s'adressant à des espèces d'Urédinées susceptibles d'envahir très largement leurs hôtes et pouvant se développer non seulement sur des feuilles, mais encore sur d'autres organes tels que les tiges, les pétioles ou les pédoncules floraux; ces réflexions nous ont conduit à choisir le *Kuehneola albid*a qui se développe surtout sur les tiges des Ronces, le *Puccinia antirrhini* qui attaque non seulement les feuilles, mais aussi les tiges, les pédoncules floraux, les sépales et même les carpelles du Muflier, le *Gymnosporangium clavariaeforme* et qui, sur l'Aubépine, apparaît à la fois sur les feuilles, les tiges, le calice et même le fruit et le *Gymnosporangium Sabinae* qui parasite ces mêmes organes chez le Poirier.

Enfin, nous avons également réalisé quelques tentatives avec le *Puccinia Malvacearum* qui possède une faible spécificité et peut infecter la plupart des Malvacées.

I. ESSAIS DE CULTURE DE *Kuehneola albida* (KUHN) MAGN. — 1. *Caractères du développement.* — *Kuehneola albida* est une Phragmidiée répandue dans le monde entier et qui parasite diverses espèces de Ronces. Dans notre pays, les premières taches d'urédospores apparaissent en automne à la face supérieure des feuilles ou sur les rameaux. Pendant l'hiver, l'infection demeure latente; au printemps, de nouvelles taches d'urédospores

provenant d'infections anciennes se montrent sur les tiges de l'année précédente et les téléospores commencent alors à se former. Les stromas d'urédospores de printemps s'étendent longuement sur les rameaux; d'abord sous-épidermiques, ils font peu à peu craquer l'écorce, qui se fend longitudinalement sur une longueur de plusieurs centimètres.

2. *Prélèvement du champignon et inoculation des cultures.* — Nous avons réalisé une première tentative au printemps en nous adressant à des tiges qui présentaient de jeunes sores d'urédospores encore recouvertes par l'épiderme. Nous les désinfectons soigneusement, en les trempant quelques secondes dans l'alcool, puis en les immergeant pendant une demi-heure dans une solution d'hypochlorite de calcium à 70 grammes par litre. Nous fendions alors l'épiderme longitudinalement et les urédospores sortaient spontanément; puis avec une pipette Pasteur très effilée et humectée, nous prélevions quelques-unes de ces urédospores que nous transportions enfin dans une goutte d'eau stérile déposée à la surface de cultures de tissus de Ronce.

Cette méthode ne nous a pas fourni de résultats satisfaisants, car le champignon ne s'est pas développé.

Nous avons alors effectué un nouvel essai en nous servant d'urédospores provenant de sores qui s'étaient développés sur des feuilles en automne. Ces stromas ne sont pas étendus comme ceux qui se forment sur les tiges au printemps, mais limités à de très petites pustules; d'autre part, l'épiderme des feuilles est très mince et recouvert de poils, si bien qu'il est impossible de stériliser la feuille avant leur déhiscence. Nous avons donc été obligé de faire le prélèvement en passant une pipette Pasteur mouillée sur des jeunes taches venant de s'ouvrir. Dans ces conditions, nous prélevions en même temps les spores d'autres champignons ainsi que des bactéries contaminant l'épiderme, ce qui nous obligea à multiplier les prélèvements pour en obtenir un certain nombre qui soient aseptiques. Ces essais d'automne n'ont pas fourni de résultats meilleurs que ceux du printemps.

Nous avons alors tenté de préciser les causes de cet échec en étudiant les conditions de la germination des urédospores de *Kuehneola albida*. Pour cela des spores ont été placées dans une goutte d'eau distillée en cellule de Van Tieghem. Nous n'avons constaté aucune germination. L'adjonction de glucose aux concentrations de 1, 2 et 5 p. 100 n'a pas amélioré ce résultat. Cette tentative infructueuse nous a amené à penser que la germination des urédospores ne doit se produire que sous l'action de substances de croissance spéciales. WILCOXON (82) a montré, en effet, que les spores de nombreux champignons germent très mal dans l'eau pure, mais que leur développement se produit normalement dès qu'on l'additionne de traces d'extraits végétaux très variés, tels que des jus de tubercules de pomme de terre, de Dahlia, de Glaïeul ou d'Orange. Le jus d'Orange paraît être particulièrement actif et il a été incorporé par MC CALLAN (45) aux suspensions de spores utilisées pour l'étude des produits anticryptogamiques. Cet auteur conseille d'utiliser le jus d'orange filtré à la concentration de 1/100<sup>e</sup>. Ces résultats nous ont suggéré de réaliser de nouveaux essais en nous servant de milieux analogues à ceux imaginés par MC CALLAN. Pour cela nous avons stérilisé du jus d'orange par filtration sur bougie et nous l'avons ajouté dans la proportion de 1 p. 100 à de l'eau stérile que nous déposions sur les tissus avant d'y mettre les spores.

Les résultats furent également négatifs; d'ailleurs des essais de germination réalisés en cellule de Van Tieghem au moyen de cette solution ne nous ont pas non plus donné

de résultats. Nous pensons donc qu'il est vain d'essayer d'obtenir des cultures de *Kuehneola* par ce procédé tant qu'on sera incapable d'en faire germer régulièrement les spores.

Nous avons également essayé d'inoculer de la même manière une autre urédinée, le *Phragmidium Rubi* à des cultures de tissus de ronce en prélevant des urédospores sur de jeunes taches et en les déposant dans une goutte d'eau déposée à la surface des tissus. Nous ne sommes pas non plus parvenus à obtenir d'infection.

II. ESSAIS DE CULTURE DE *Puccinia Antirrhini* (DIET.) HOLW. — 1. *Caractères généraux du développement.* — La Rouille du Muflier est un parasite qui, en raison de son intérêt horticole, a été beaucoup mieux étudié que *Kuehneola albida*. Ses urédospores forment de petites pustules qui apparaissent durant tout l'été sur les feuilles. Elles sont localisées surtout à leur face inférieure; il s'en forme également sur les pétioles, les tiges et même sur le calice et la capsule du fruit, ce qui montre que presque tous les organes aériens peuvent être atteints par le champignon. Durant toute la belle saison, la maladie se transmet par les urédospores avec la plus grande facilité. Leur germination peut être obtenue facilement. Mc CALLAN (44) et ARONESCU-SAVULESCU (1) ont montré qu'elle se produit en deux ou trois heures entre 5 et 20°. Ces auteurs ont pu réaliser très aisément des inoculations artificielles en pulvérisant une suspension d'urédospores sur des plantes entières, les premiers symptômes de la maladie apparaissaient sept à huit jours après la contamination. Ils consistaient en un léger gonflement et une décoloration de l'endroit infecté et deux jours plus tard, l'épiderme se déchirait et les urédospores apparaissaient alors.

À la fin de l'été se forment des téléospores localisées dans les mêmes régions que les urédospores. D'après ARONESCU-SAVULESCU ces téléospores germent avec la plus grande difficulté. On ne connaît pas de forme oecidienne et on ignore si cette urédinée est autoïque ou hétéroïque.

2. *Prélèvement des spores et inoculation des tissus.* — La rapidité d'évolution du parasite rend facile le prélèvement aseptique des urédospores. Nous réalisons cette opération de la manière suivante : on choisit des feuilles présentant un certain nombre de taches blanches. Elles sont désinfectées en les plongeant rapidement dans de l'alcool puis en les trempant pendant dix minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium à 70 grammes par litre. On les rince alors à l'eau stérile et on les abandonne enfin pendant deux jours à l'air dans des boîtes de Petri humides maintenues à 20°. Dans la plupart des cas, la moitié environ des pustules s'ouvrent et laissent apparaître leurs spores.

On prélève ces spores avec une pipette Pasteur très effilée et légèrement humide et on les transporte sur des cultures de tissus préalablement humectées avec un peu d'eau stérile. Ces cultures consistent soit en fragments de tiges ayant produit des cals, soit en colonies provenant d'une souche ayant subi plusieurs repiquages. Dans aucun cas, malheureusement, nous n'avons pu réaliser l'infection de ces cultures. Cet échec ne peut être attribué à une mauvaise germination des spores, car en les plaçant pendant quelques heures dans une goutte d'eau en cellule de Van Tieghem nous avons pu constater que plus de la moitié émettaient un tube germinatif. Nous pensons donc que les variétés de Muflier sur lesquelles nous avons travaillé possédaient une immunité accentuée vis-à-vis du *Puccinia*. Il existe en effet divers degrés dans la résistance à la rouille des variétés cultivées. Les auteurs américains citent un certain nombre de races très résistantes et qui, pour cette raison, sont propagées par les horticulteurs de préférence aux autres. Peut-être avons-nous mis en culture par hasard, des tiges appartenant

à des variétés résistantes. En France, le Muflier est beaucoup moins cultivé qu'aux États-Unis et on ne peut se procurer des variétés bien définies dont la résistance est connue. On ne peut non plus choisir pour les cultures de tissus des plantes très attaquées par la rouille, car il est nécessaire d'effectuer les prélèvements au printemps sur des plantes jeunes à une époque où la maladie, qui évolue au cours de l'été, ne s'est pas encore déclarée.

III. ESSAIS DE CULTURE DE *Puccinia Malvacearum* MONT. — 1. *Caractères du développement.* — La rouille des Mauves est une des espèces d'urédinées les moins spécialisées que l'on connaisse, car elle peut se développer sur la plupart des Malvacées herbacées. Elle possède un cycle de développement particulièrement simple.

Les basidiospores germent en donnant naissance à un mycélium haploïde qui se développe à l'intérieur de la plante. Ce mycélium forme sous l'épiderme un faux tissu composé d'éléments cellulaires uninucléés serrés et rangés parallèlement les uns aux autres. Ces éléments se conjuguent soit deux à deux, soit avec des hyphes indifférenciées et les cellules résultant de cette plasmogamie produisent des hyphes binucléées très courtes sur lesquelles naissent directement les téléutospores.

Ces téléutospores apparaissent à la face inférieure des feuilles sur les pétioles ou sur les tiges où elles forment des pustules brunes et globuleuses. Elles germent dans l'atmosphère en produisant quatre basidiospores qui peuvent infecter directement les tissus des Malvacées.

2. *Prélèvement aseptique des spores et inoculation des cultures:* — Nous avons songé à utiliser pour le prélèvement des spores de *Puccinia Malvacearum* la méthode que nous avons utilisée pour le *Puccinia Antirrhini*. Les jeunes spores de la rouille des Malvacées se forment en effet sous l'épiderme et sont pendant longtemps entièrement recouvertes par celui-ci. Si bien que dans ce cas également nous avons essayé de stériliser l'organe infecté avant que l'épiderme ne se déchire sous la poussée des spores. Mais nous avons remarqué à ce moment-là que les téléutospores ne sont pas encore mûres et ne peuvent germer.

Pour effectuer ces prélèvements nous avons opéré d'une autre manière. Nous avons placé des fragments de tige de Mauve et de Rose-trémière couvertes de jeunes pustules sous une cloche tendue intérieurement de papier filtre humide afin d'y maintenir une atmosphère saturée; la base des tiges plongeait dans un récipient plein d'eau. Au bout de quelques jours, la plupart des téléutospores avaient germé pour donner des basidiospores. Ces basidiospores ont été prélevées en promenant à la surface des régions infectées une pipette effilée en tube capillaire et légèrement humectée, puis transportées dans une goutte d'eau stérile préalablement déposée à la surface de cultures de tissus d'Abutilon, de *Malva* et d'*Althea*. Malheureusement les résultats ont été entièrement négatifs; nous n'avons pu réaliser aucune contamination des tissus par le *Puccinia*.

À la suite de ce nouvel insuccès nous avons tenté de cultiver directement des tissus parasités. Nous avons choisi à cet effet des jeunes tiges présentant des pustules encore recouvertes par l'épiderme. Ces tiges ont été désinfectées à l'hypochlorite suivant la technique ordinaire, puis soigneusement épluchées en prenant soin de ne pas éliminer les jeunes sores. Malgré toutes les précautions prises, toutes nos cultures ont été infectées par des saprophytes variés et ont péri avant d'avoir pu se développer.

IV. ESSAIS DE CULTURE DE *Gymnosporangium clavariaeforme* (JACQ.) REES. — 1. *Caractères généraux du développement.* — Les *Gymnosporangium* sont des Urédinées hétéroïques.

Le mycélium primaire de *G. clavariaeforme* se développe à l'intérieur de divers organes de l'Aubépine (feuilles, tiges, ovaies). Les organes infectés s'épaississent et se tuméfient ; sur ces tumeurs apparaissent les fructifications, c'est-à-dire les pycnides, puis les écidies.

Le mycélium secondaire se développe à l'intérieur des tissus de *Juniperus communis* en provoquant le renflement des jeunes tiges. Au printemps ce mycélium produit d'énormes stromas qui font éclater l'écorce et répandent au dehors des masses gélatineuses jaune clair formées de téléutospores agglomérées. Ces masses épaisses de 4 à 5 centimètres et longues de 3 à 4 centimètres se gélifient sous l'effet de la pluie et les téléutospores germent sur place en émettant un promycélium donnant naissance à quatre basidiospores qui infectent à nouveau les Aubépines.

2. *Prélèvement aseptique du champignon et inoculation des cultures.* — Il est relativement facile de prélever aseptiquement des téléutospores de *G. clavariaeforme*, car elles forment des masses très volumineuses faciles à désinfecter. Il suffit pour cela de faire tremper ces fructifications pendant quelques instants dans une solution d'hypochlorite de calcium à 70 grammes par litre, puis d'éliminer avec un scalpel les parties attaquées par l'antiseptique. Si on laisse ensuite pendant vingt-quatre heures les téléutospores dans une boîte de Pétri stérile garnie de papier filtre mouillé, elles germent en formant leur promycélium qui produit aussitôt des basidiospores. C'est avec des téléutospores développées de cette manière que nous avons tenté d'infecter des cultures de tissus d'Aubépine ; pour cela nous avons prélevé avec une aiguille flambée de minuscules fragments de la masse gélatineuse des téléutospores que nous avons portés dans une goutte d'eau déposée à la surface des cultures. La souche de cultures de tissus d'Aubépine dont nous disposions à cette époque était encore jeune et se développait irrégulièrement. Pour ne pas la perdre nous n'avons pas voulu sacrifier pour cette expérience les plus belles colonies et nous n'avons utilisé que quelques cultures âgées ayant cessé de se développer, si bien qu'elle a échoué. En raison de la rareté du champignon et de la courte période durant laquelle on peut recueillir des téléutospores, il ne nous a pas été possible de renouveler cette expérience dans de meilleures conditions. Nous pensons que ces cultures associées présenteraient un grand intérêt en raison des tumeurs que provoque le champignon sur les organes qu'il infecte et nous espérons pouvoir recommencer ces essais ultérieurement. Il doit d'ailleurs être possible dans ce cas également de mettre en culture de jeunes tiges déjà infectées et portant des débuts de tumeur, ce qui éviterait l'opération toujours délicate et très aléatoire de l'inoculation.

Une espèce voisine *Gymnosporangium Sabinae* (Dicks.) WINT se développe dans les mêmes conditions sur le Genévrier Sabine et le Poirier, mais nous n'avons pas eu encore l'occasion d'en tenter la culture.

V. *CONCLUSIONS.* — Nous ne pensons pas que ces essais infructueux de culture d'Uredinées indiquent que le parasite ne puisse se développer sur des tissus cultivés *in vitro*. Mais nous croyons que cet insuccès est plutôt dû à une mauvaise méthode d'inoculation. Nous avons en effet cherché à contaminer par cette méthode non plus des tissus cultivés *in vitro*, mais des fragments de Muflier ou de Mauve isolés aseptiquement et dans ce cas également le résultat a été négatif. Or, l'expérience nous montre dans les conditions naturelles ces organes sont fortement attaqués, ils peuvent donc servir de support au *Puccinia*. Il semble donc bien que c'est la méthode que nous avons employée pour les contaminer qui est déficiente.

Nous pensons qu'une autre voie donnerait plus facilement des résultats. C'est celle qui consiste à mettre en culture des organes déjà contaminés et contenant le mycélium du parasite.

Le mycélium des Urédinées que nous avons étudiées est très superficiel et ne pénètre pas profondément dans les tissus. Chez d'autres espèces, au contraire, l'infection se généralise dans un organe entier ou même dans toute la plante. En s'adressant à de telles espèces et en isolant aseptiquement des fragments de tiges infectées, il doit être possible de réaliser d'emblée la culture associée des tissus et du parasite.

#### D. Cultures de virus.

I. GÉNÉRALITÉS. — On sait depuis longtemps que les plantes peuvent contracter des maladies infectieuses dont l'agent pathogène est indécélable par l'observation microscopique. Dès la fin du siècle dernier, IWANOWSKY (32), puis BEIJERINCK (5) constatèrent que le facteur de la Mosaïque du Tabac traverse les filtres qui arrêtent toutes les bactéries visibles, et qu'il est impossible de l'observer au microscope. A ces agents invisibles on a donné le nom de Virus.

Depuis cette époque, on a découvert de nombreux virus susceptibles de s'attaquer aux plantes. Cependant leur nature n'a été définitivement établie qu'au cours de ces dernières années, après que STANLEY (69), en 1935, eût isolé un nucléoprotéide cristallisé possédant toutes les propriétés du virus de la Mosaïque du Tabac. En 1936, BAWDEN et PIRIE (4), en utilisant des méthodes analogues, ont obtenu sous forme pure et cristallisable le virus du Bushy-Stunt de la Tomate et montré que dans ce cas, comme dans celui du virus de la Mosaïque du Tabac, il s'agissait d'un nucléoprotéide.

Il n'est pas surprenant que ces agents pathogènes ne puissent être cultivés dans des milieux inertes puisque leur multiplication résulte vraisemblablement d'une déviation du métabolisme des cellules de la plante attaquée.

Le problème de la conservation des virus est difficile à résoudre. En effet, leur activité *in vitro* ne se maintient que rarement au delà de quelques semaines et, pour les conserver, on est obligé de les inoculer périodiquement à des plantes saines cultivées en serre et isolées de tout contact infectieux. Cette méthode n'est pas sans présenter des inconvénients; même dans ces conditions, il est bien malaisé de se mettre à l'abri de toute contamination, soit par les insectes, soit au cours des opérations culturales; si bien que l'entretien d'une collection de virus nécessite un travail matériel considérable et beaucoup d'espace. Pour éviter ces inconvénients nous avons songé à utiliser, pour conserver des virus, non plus des plantes entières, mais des cultures de tissus qui se manipulent presque aussi facilement que des cultures de Bactéries ou de Champignons. Ces cultures peuvent, en outre, permettre de rechercher l'influence de diverses conditions sur la multiplication du virus, alors que cette étude est presque impossible sur la plante entière. La réalisation des premières cultures de ce genre est due à WHITE (75); dès 1934, cet auteur eut en effet l'idée de cultiver, sur des racines isolées de Tomates, différents virus tels que le virus de la Mosaïque du Tabac, sa variété «Aucuba» et le virus de la Mosaïque du Concombre. Pour réaliser ses cultures, il isolait des fragments de tige de Tomates atteintes de Mosaïque et les plaçait dans une atmosphère humide afin de leur faire produire des racines adventives. Ces racines étaient alors ensemencées dans un milieu approprié et le virus qu'elles contenaient se multipliait au cours de leur croissance. Toutefois, il ne parvint pas à inoculer la maladie à des cultures de racines saines et fut constamment obligé de partir de plantes entières contaminées par les virus. Plus récemment, SEGRETAIN (67-68) est parvenu à son tour à cultiver le virus de la Mosaïque du Tabac en se servant comme support de fragments de tige de cette plante et

il a pu inoculer la maladie à des tissus sains cultivés *in vitro*, mais il ne put maintenir ses cultures en survie indéfinie par des repiquages et celles-ci ne subsistèrent que quelques mois.

II. ESSAIS PRÉLIMINAIRES. — Nous avons entrepris des travaux analogues dans le but d'obtenir des cultures plus durables, et pour cela nous avons isolé des tissus de plantes malades et nous les avons cultivés suivant notre technique habituelle. Nos premières tentatives ont porté sur des tissus de Tabac atteint d'une maladie causée par un complexe composé du virus de la Mosaïque du Tabac et du Virus I du Concombre. Ce complexe détermine chez le Tabac et la Tomate une affection sévère étudiée par LIMASSET et M<sup>lle</sup> AUGIER DE MONTGREMIER (42), et dont le caractère essentiel est une déformation des feuilles qui, dans certains cas, peuvent prendre l'aspect de simples vrilles. Des fragments de tige de plantes atteintes de cette maladie ont été mis en culture sur un milieu renfermant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ . Ils ont produit des cals volumineux qui ont été repiqués deux mois plus tard sur un milieu ne contenant plus que 0,1 mg. par litre d'hétéroauxine ( $10^{-7}$ ). Ces cultures ont continué à se développer assez lentement et nous avons entretenu leur activité par des repiquages réguliers effectués tous les deux mois. A ce moment-là, nous avons alors essayé de déceler la présence des deux virus dans les tissus de cette souche en inoculant six pieds de Tabac au stade quatre feuilles à l'aide du jus obtenu en broyant trois cultures. Nous avons constaté que vingt-deux jours plus tard la Mosaïque du Tabac se manifestait de façon distincte sur toutes les plantes inoculées et quelques jours après des déformations foliaires caractéristiques attestant la présence du Virus I du Concombre atteignaient deux des Tabacs inoculés. Cette expérience préliminaire avait montré qu'il est possible de cultiver *in vitro* certains virus qui atteignent les Solanées et nous a encouragés à entreprendre de nouvelles recherches plus approfondies. Ces nouvelles recherches avaient pour but de réaliser des cultures associées de tissus de Tabac et de virus de la Mosaïque du Tabac, de virus X et de virus Y de la Pomme de terre.

### III. CULTURE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC.

1. *Culture sur tissu normal.* — Pour obtenir des cultures de virus de la Mosaïque du Tabac, nous sommes parti de tiges de tabac de la variété « White Burley » auxquels on avait transmis la maladie et qui en présentaient les symptômes caractéristiques sur le feuillage. Nous avons ensemencé des fragments de ces tiges, suivant notre technique habituelle, sur des milieux contenant de l'acide naphthyle acétique à la concentration de  $5.10^{-7}$ . Nous avons également ensemencé comparativement des fragments de tige de plantes saines ayant le même âge. Les deux catégories de fragments ne tardèrent pas à se développer et produisirent en deux mois des cals volumineux. Ils furent alors repiqués sur un milieu contenant de l'hétéroauxine à la dose de  $10^{-7}$  où ils continuèrent à proliférer très lentement. Ces tissus furent repiqués tous les deux mois sur le même milieu, mais leur croissance demeura très médiocre. Les cultures de tissus infectés présentaient le même aspect que celles de tissus sains; aucun caractère morphologique ou anatomique ne permettait de les distinguer et seule l'inoculation de jeunes plantes à l'aide du jus de tissus broyés permettait de déceler la maladie.

2. *Culture sur des tissus accoutumés.* — Après quatorze mois de culture, la croissance de trois colonies tissulaires de la souche infectée par le virus s'améliora soudainement. Ces colonies qui jusque-là étaient brunâtres et produisaient de nombreuses cellules

géantes, se mirent à proliférer activement pour former des masses de parenchyme blanc et ferme. L'étude des réactions de ces tissus vis-à-vis de l'acide naphthyle acétique nous permit de constater qu'ils se développaient vigoureusement en l'absence de cette substance et avaient perdu toute sensibilité vis-à-vis de ses propriétés excitoformatrices. Ces colonies avaient donc subi le phénomène d'accoutumance à l'hétéroauxine. Nous avons alors cherché si elles étaient toujours infectées par le virus de la Mosaïque du Tabac. Pour cela de jeunes plants de Tabac ont été inoculés avec le jus provenant du broyage de deux cultures et les symptômes de la maladie n'ont pas tardé à se déclarer.

3. *Culture des tissus de Crown-Gall.* — La lenteur de la prolifération des tissus normaux de Tabac et l'irrégularité avec laquelle se produit le phénomène d'accoutumance qui permet d'obtenir une meilleure croissance nous ont incité à tenter la culture du virus de la Mosaïque du Tabac sur des tissus de Crown-Gall qui se développent plus activement. Pour cela nous avons inoculé le *Phytomonas tumefaciens* à de jeunes tiges de Tabac de la variété « White Burley », auquel on avait transmis la Mosaïque quelques jours auparavant. Des tumeurs se développèrent rapidement sur les tiges au point d'inoculation de la bactérie. Deux mois plus tard, nous avons prélevé aseptiquement ces tumeurs et nous en avons mis des fragments en culture dans des milieux renfermant ou non de l'hétéroauxine. Nous avons réalisé comparativement des cultures témoins à partir de tumeurs produites par l'action du *Phytomonas* sur des plantes dépourvues de virus.

Les tissus tumoraux se sont développés avec une grande rapidité. Deux mois plus tard, ils furent repiqués sans hétéroauxine et leur croissance se poursuivait avec la même régularité. Les cultures de tissus provenant de plantes infectées étaient absolument identiques à celles obtenues à partir de plantes saines ; rien dans leur aspect extérieur ni dans leur structure anatomique ne permettait de déceler les virus. Nous avons cependant pu vérifier sa présence en inoculant le jus provenant du broyage de deux cultures à quelques plantes saines, dont les feuilles montrèrent rapidement les symptômes caractéristiques de la maladie.

4. *Inoculation du virus aux cultures.* — Au lieu de partir de plantes infectées pour obtenir des cultures de virus, nous avons cherché à inoculer directement des tissus sains cultivés *in vitro*, et, pour cela, nous avons opéré uniquement sur des cultures de Crown-Gall qui se multiplient très activement. *A priori* cette inoculation semblait être possible car le virus de la Mosaïque du Tabac se transmet par de simples procédés mécaniques.

On peut par exemple l'introduire dans les plantes au moyen de blessures minimales telles que : ruptures de poils, déchirures des cellules épidermiques, etc. L'inoculation se produit dans les meilleures conditions lorsque les lésions sont très faibles et se cicatrisent rapidement. Pour cela on utilise généralement un abrasif comme le carborundum dont on saupoudre la feuille à inoculer ; on dépose ensuite quelques gouttes de jus infectieux à la surface de cette feuille, puis on étale ce jus sur tout le limbe en le frottant très légèrement avec une baguette de verre ; c'est cette méthode qui nous a servi pour transmettre la maladie à des cultures saines. Nous opérons de la manière suivante : une culture saine est placée dans une boîte de Petri et l'on saupoudre la surface avec un peu de carborundum stérilisé à l'autoclave ; puis, avec une pipette, on dépose une goutte de jus infectieux dans la région recouverte par cette poudre, et on étale ensuite très légèrement ce jus avec un agitateur stérile afin de provoquer de très légères déchirures des cellules superficielles. Nous avons cherché à obtenir un jus

infectieux aseptique de deux manières différentes : soit en filtrant un jus brut sur bougie de porcelaine, soit en stérilisant des pétioles de feuilles de Tabac infectées par trempage dans l'alcool et flambage, et en les écrasant dans un tube stérile. Ce deuxième procédé nous a fourni des résultats bien supérieurs au premier. Les particules de virus de la Mosaïque du Tabac ont, en effet tendance à s'agglomérer entre elles assez rapidement, et elles sont alors facilement retenues par la bougie de porcelaine, si bien qu'il arrive parfois que le jus filtré ait perdu toutes ses propriétés infectieuses. Le virus est, par contre, assez résistant à la chaleur et le flambage des tissus ne l'échauffe pas suffisamment pour altérer sa virulence.

Des contaminations de plantes entières réalisées un mois plus tard, à l'aide de jus de cultures nous ont permis de contrôler le résultat de l'opération. Nous avons pu nous rendre compte de cette manière que l'inoculation réussissait dans tous les cas.

5. *Étude comparative de la multiplication des virus dans les tissus cultivés in vitro et dans la plante entière.* — L'inoculation de jus provenant du broyage des tissus cultivés à de jeunes plants de Tabac, permet de constater que ces tissus renferment toujours le virus; mais ce renseignement est purement qualitatif et ne permet pas d'apprécier la quantité de virus contenue dans les tissus. Lorsqu'on désire procéder au dosage du virus, on peut recourir par exemple à une réaction sérologique; pour cela, on prépare un immunosérum de Lapin en injectant par voie intraveineuse à l'animal une préparation purifiée du virus de la Mosaïque du Tabac. Nous avons procédé à l'examen des floculations en tubes à hémolyse la méthode de JERNOLJEV et H. RUSKA (1939). Une goutte de l'immunosérum est mélangée sur la lame porte-objet du microscope avec une goutte de jus centrifugé de la culture éprouvée; l'examen est ensuite réalisé à l'aide d'un microscope à fond noir. Cette microméthode, d'abord utilisée uniquement pour les diagnostics, se prête également au dosage du virus (43). La détermination de la plus grande dilution du jus virulent donnant encore un précipité perceptible (dilution limite) permet en effet de déterminer la teneur en virus de ce dernier par rapport à un témoin connu.

En nous servant de cette technique<sup>(1)</sup> nous avons entrepris de comparer la teneur en virus des deux souches de tissus sur lesquelles nous le cultivons (souche accoutumée et souche tumorale) avec la teneur des tissus d'une plante entière; nous avons alors constaté que la teneur en virus d'un jus provenant de cultures de tissus de tumeur était 30 à 40 fois plus faible que celle d'un jus de feuille de Tabac infecté. Dans les tissus accoutumés la quantité de virus était encore moindre, si bien qu'on ne le décelait généralement pas avec le sérum utilisé, mais sa présence a pu être mise en évidence par des inoculations au *Nicotiana Tabacum* et au *Nicotiana glutinosa*. Ainsi le virus de la Mosaïque du Tabac se multiplie bien moins activement, dans les tissus tumoraux et accoutumés cultivés *in vitro* que dans la plante entière. Cette particularité est actuellement difficile à expliquer. Toutefois si l'on considère que, dans la plante entière, la teneur en virus des points végétatifs est beaucoup plus faible que celle des tissus différenciés, on peut admettre, à titre de simple hypothèse, que le caractère méristématique des tissus tumoraux et accoutumés leur confère des propriétés comparables à celles des méristèmes primaires.

IV. CULTURE DU VIRUS X DE LA POMME DE TERRE. — Le virus X est très répandu dans les plantations de Pommes de terre. A l'état isolé, il est d'ordinaire relativement peu

(1) Cette nouvelle méthode de dosage était en cours de mise au point au moment de notre étude et nous tenons à remercier M<sup>lle</sup> AUGIER DE MONTGEMMAY qui a obligeamment effectué nos dosages.

dangereux, et ne provoque qu'une légère mosaïque; mais, lorsqu'il est associé à d'autres virus, comme le virus A et surtout le virus Y, il produit des lésions plus sévères; on peut l'inoculer, par simple friction, à diverses Solanées, comme le Tabac, le *Datura* ou la *Jusquiame*.

1. *Culture sur tissu normal*. — Nous avons tenté de cultiver le virus dans des colonies de tissus normaux de Tabac. Pour cela, des tiges de jeunes plantes de Tabac inoculées par l'agent pathogène ont été mises en culture suivant notre technique habituelle, dans des milieux contenant de l'acide naphthyle-acétique à la concentration de  $3 \cdot 10^{-7}$ ; les cals formés par les fragments ont été repiqués tous les deux mois dans des milieux contenant de l'acide naphthyle-acétique, à la concentration de  $10^{-7}$ ; la croissance s'est poursuivie lentement et irrégulièrement pendant dix-huit mois; à ce moment-là trois cultures ont alors été broyées, et le jus ainsi obtenu a été inoculé à de jeunes plantes de Tabac qui ne tardèrent pas à montrer les symptômes caractéristiques de la maladie lesquels consistent dans l'apparition de cercles décolorés sur les feuilles de la plante, que les auteurs de langue anglaise désignent sous le nom de *Ring-Spot*.

2. *Culture sur tissus de Crown-Gall*. — Nos cultures atteintes de virus X de la Pomme de terre n'ont pas présenté de phénomène d'accoutumance, et nous avons fini par perdre la souche après dix-huit mois de culture. Nous avons alors tenté de cultiver ce virus sur des tissus de Crown-Gall de Tabac qui se développent vigoureusement; pour cela, nous avons transmis ce virus à des colonies tissulaires saines par friction avec du carborundum, en utilisant la technique employée pour transmettre le virus de la Mosaïque du Tabac. Pour prélever le jus aseptique dans les pétioles de plantes malades, nous n'avons plus cette fois flambé ces organes, opération qui aurait risqué de détruire l'agent pathogène qui est assez fragile, mais nous les avons stérilisés par immersion d'une demi-heure dans une solution d'hypochlorite de calcium à 70 grammes par litre et nous en avons exprimé le jus dans un tube stérile après les avoir épluchés. Nous avons contrôlé le résultat de ces infections en inoculant quatre mois plus tard de jeunes plants de Tabac à l'aide du jus provenant de colonies traitées. Les plantes inoculées n'ont pas tardé à présenter les symptômes caractéristiques du virus X.

Nous avons cherché à déceler, par la méthode sérologique, la quantité de virus contenue dans ces cultures. Nous avons constaté qu'elle était très inférieure à celle des tissus de la plante entière; ainsi le virus X, comme le virus de la Mosaïque du Tabac, paraît incapable de se multiplier aussi activement dans les tissus tumoraux que dans les organes normaux.

3. *Culture sur tissus de Jusquiame*. — Nous avons également réussi à cultiver le virus X de la Pomme de terre sur des tissus de la racine de *Jusquiame*. La culture des tissus de cette plante a été l'objet des travaux de GAUTHERET et de TELLE (71) et c'est pourquoi nous ne l'avons pas signalée dans la première partie de notre exposé. Pour réaliser ces cultures nous avons inoculé la maladie à de jeunes plantes dont nous avons ensemencé des fragments de racines comprenant du liber et du parenchyme vasculaire, en présence d'acide naphthyle acétique à la concentration de  $10^{-6}$ ; ils ont produit des cals très volumineux qui ont été repiqués trois fois sur des milieux renfermant deux fois moins d'hétéro-auxine ( $5 \cdot 10^{-7}$ ); ces tissus étaient en tous points identiques à ceux des cultures saines; seule l'inoculation de jus de jeunes plantes de Tabac a permis d'y caractériser le virus X.

Nous avons également cultivé ce virus sur des tissus de Crown-Gall de *Jusquiame*;

pour cela, nous avons inoculé le *Phytophthora tumefaciens* au niveau du collet de plantes porteuses du virus X. D'énormes tumeurs (Pl. XXI, fig. B) se sont développées au point d'inoculation ; nous en avons ensemencé des fragments, suivant notre technique ordinaire, sur des milieux dépourvus d'hétéroauxine ; leur développement a été d'abord excessivement rapide, puis s'est légèrement ralenti par la suite. Nous avons recherché, après six mois de culture, si ces tissus renfermaient toujours le virus. L'inoculation du jus extrait du broyage de deux colonies à de jeunes Tabacs a montré une réaction positive ; mais nous n'avons pu encore apprécier les teneurs en virus de ces deux types de tissus, et nous ignorons si le processus tumoral provoque dans ce cas une diminution de la teneur en virus comparable à celle que nous avons observée chez le Tabac.

V. CULTURE DU VIRUS Y DE LA POMME DE TERRE. — Le virus Y est surtout nuisible à la Pomme de terre. Les plantes atteintes présentent des symptômes très variables suivant la variété atteinte ; allant depuis la mosaïque légère à peine visible jusqu'à des nécroses brunes qui donnent aux feuilles un aspect bigarré et peuvent dans les cas graves provoquer leur chute.

Dans la nature, ce virus est transmis par divers Pucerons : notamment le *Myzus persicae*. Mais on parvient au laboratoire à l'inoculer par friction. C'est ce que nous avons tenté de faire en utilisant des cultures de tissus de tumeurs de Tabac. Pour cela, nous avons stérilisé des pétioles de Tabacs malades à l'hypochlorite de calcium, et après épluchage, nous en avons exprimé le jus virulent en les écrasant dans un tube à essais stérile. Nous avons ensuite inoculé le virus à des cultures de Crown-Gall de Tabac en opérant de la manière suivante : la colonie tissulaire était placée dans une boîte de Pétri stérile puis saupoudrée avec un peu de carborundum au préalable stérilisé à l'autoclave. Nous déposons ensuite une goutte de jus virulent sur la surface de cette colonie couverte d'abrasif et nous frottions très légèrement celle-ci avec une baguette de verre de façon à produire les lésions des cellules superficielles permettant la pénétration du virus.

Les cultures inoculées ont continué à proliférer normalement et quatre mois plus tard, alors que celles-ci avaient subi 2 repiquages, nous avons constaté la régularité de l'infection, en inoculant le jus de ces cultures à de jeunes tabacs, dont les feuilles ont présenté les symptômes caractéristiques de la maladie.

En résumé, ces essais, bien que très fragmentaires, nous ont montré la possibilité de maintenir *in vitro* sur des cultures de tissus, trois des principaux virus des solanées : le virus de la Mosaïque du Tabac, le virus X et le virus Y. Aucun de ces virus n'altère de façon sensible les tissus et ceux-ci continuent à proliférer de manière comparable aux tissus sains. Pourtant, nous avons pu vérifier dans certains cas, que, même après deux très longues périodes de culture *in vitro*, ils conservaient toute leur virulence. Nous avons enfin constaté que, dans le cas de la Mosaïque du Tabac, les tissus tumoraux et accoutumés renfermaient beaucoup moins de virus que les tissus de la plante entière et nous nous proposons d'étudier le mécanisme de cette diminution.

## CHAPITRE V.

## CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES ET CONCLUSIONS.

Le but principal de notre travail a été d'obtenir la culture associée de tissus végétaux et de parasites obligatoires, incapables de se développer en dehors de leur hôte normal. Ces recherches nous ont amené à réaliser des cultures de tissus d'espèces très diverses qui, pour la plupart, n'avaient fait l'objet d'aucune tentative. Nous examinerons successivement les considérations générales suscitées par les principaux résultats que nous avons acquis sur cette question, puis celles relatives à nos essais de culture de divers agents pathogènes.

A. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA CULTURE DES TISSUS. — Au moment où nous avons commencé nos recherches, on ne savait cultiver qu'un petit nombre de tissus normaux provenant tous d'organes tubérisés tels que les racines de Carotte, de Chou-Navet, d'Endive, de Scorsonère, ou le rhizome de Topinambour. Le développement normal de ces organes révèle une prolifération cellulaire exceptionnellement intense. Les variétés cultivées qui les produisent ont été sélectionnées par l'homme dans un but alimentaire depuis la plus haute antiquité et constituent en quelque sorte des anomalies puisque les formes sauvages dont elles dérivent, par exemple : la Carotte ou la Chicorée sauvages, ne forment pas de tels organes. Il y a une relation évidente entre cette faculté de tubérisation et l'aptitude de leurs tissus à proliférer *in vitro*, si bien que l'on pouvait se demander si les tissus d'autres espèces herbacées seraient susceptibles de fournir eux aussi des cultures durables. Nos recherches ont établi qu'il en est bien ainsi. Nous avons pu, en effet, réaliser la culture des tissus de diverses plantes herbacées, non tubéreuses comme le Muflier, la Mauve, le Tabac, mais cependant avec la plus grande difficulté.

Les végétaux ligneux à tige pérennante et les arbres en particulier manifestent également une grande activité cambiale qui se traduit principalement par la formation d'un tronc épais. Les premières tentatives de GAUTHERET ont porté sur la culture du tissu cambial de différents arbres, mais à l'époque à laquelle cet auteur réalisa ses premiers travaux, la technique n'était pas suffisamment avancée et c'est pourquoi il ne put obtenir de cultures indéfinies. Nos recherches ont établi que cette culture est possible et même relativement aisée. Ainsi, dans ce cas également, il semble bien y avoir une relation entre l'activité cambiale d'une espèce et son aptitude à proliférer *in vitro*. Nous avons réalisé en outre un troisième type de cultures de tissus en partant de fragments de lianes diverses, Vigne, Vigne-vierge, *Cissus*, Ronce. Enfin, nous avons obtenu le développement *in vitro* de nombreux tissus de Crown-Gall : Vigne, Tabac, Abutilon, Jusquiame, confirmant ainsi les résultats obtenus par WHITE et BRAUN (80-81) sur le Soleil, la Pervenche de Madagascar et, plus récemment, par GAUTHERET (25-26) sur le Topinambour et la Scorsonère.

Nos recherches ont donc établi que la technique des cultures de tissus peut être généralisée à un grand nombre de Dicotylédones et que l'on peut cultiver non seulement des tissus plus ou moins pathologiques, mais aussi des tissus vraiment normaux.

L'observation des cultures d'un très grand nombre d'espèces nous a permis de constater qu'il n'existe pas de relation entre la faculté de proliférer *in vitro* et la position des espèces dans la classification. C'est ainsi que les tissus de la plupart des Ampélidées prolifèrent vigoureusement *in vitro*, tandis que ceux de quelques espèces comme : *Tetrastigma voinieriana* ne se développent pas du tout. De même les Ronces que nous avons étudiées nous ont fourni aisément des cultures durables, alors que nous avons été incapable d'en obtenir avec le Rosier. Il ne paraît pas non plus y avoir de lien entre les caractères morphologiques des néoformations obtenues *in vitro* et la position systématique des plantes ayant servi à réaliser les cultures. Nous avons en effet observé chez les diverses lianes de la famille des Ampélidées des types de croissance très différents. Les tissus des tiges de la Vigne indigène, *Vitis vinifera*, possèdent une polarité très marquée qui se traduit par la formation de cals uniquement sur la face radicale des fragments, tandis que celles de *Parthenocissus tricuspidata* en paraissent dépourvues et prolifèrent en n'importe quelle région des explantats. Une différence analogue s'observe entre les cultures de Ronce et d'Aubépine qui appartiennent toutes deux à la même famille. De même les deux *Parthenocissus* que nous avons étudiés prolifèrent très différemment. Les fragments de tige de *P. quinquefolia* produisent une grande quantité de racines, tandis que ceux de *P. tricuspidata* n'en forment que rarement. Signalons enfin que les tissus de Ronce se développent bien à l'intérieur du milieu de culture, alors que le contact de ce dernier inhibe totalement la croissance de ceux d'autres rosacées comme l'Aubépine. Ainsi, on ne peut déduire des résultats obtenus sur une plante, le mode de développement d'une autre, même très voisine, et encore moins les généraliser à toute une famille.

Nous avons constaté une étroite relation entre la faculté de proliférer *in vitro* et l'activité de la plante dont proviennent les tissus mis en culture. Signalons en effet qu'en pratiquant des prélèvements sur des plantes à diverses périodes de leur cycle végétatif, nous avons en général constaté que plus les tissus se développent activement dans la plante entière et mieux ils prolifèrent *in vitro*. C'est ainsi que l'on obtient les meilleurs résultats en mettant en culture des fragments de tige de Vigne ou de Vigne-vierge en mai-juin, au moment où la croissance de la plante est la plus active, alors qu'en automne, quand la végétation est arrêtée, ces mêmes fragments d'organes cessent de se développer; de même les tissus de Mauve ne prolifèrent *in vitro* que s'ils proviennent d'une plante très jeune n'ayant pas encore fleuri. Pourtant, dans certains cas, des tissus âgés sont au contraire capables de s'accroître *in vitro* plus activement que de très jeunes tissus. C'est ainsi que lorsqu'on prélève des fragments de tige de Tabac au moment de la floraison de la plante, on constate qu'ils produisent des cals plus volumineux que les extrémités de très jeunes tiges. Enfin, il semble également exister une relation entre la puissance de développement d'une espèce et l'activité de la croissance de ses tissus *in vitro*. C'est ainsi que le *Parthenocissus tricuspidata*, qui est une liane à végétation exubérante, produit des cultures qui s'accroissent en deux mois de plus de 3 grammes, alors que celles de *Cissus incisa*, plante dont le développement est très réduit, n'augmentent pendant la même période que de quelques centaines de milligrammes.

Nous avons étudié l'action des hétéroauxines sur tous les tissus que nous avons cultivés; cette étude nous a permis de constater, conformément aux résultats de GAUTHERET, que ces substances stimulent leur développement dans la plupart des cas. Ceux de certaines espèces, comme le *Parthenocissus tricuspidata*, ne prolifèrent pas du tout sans hétéroauxine, mais par contre, en présence de ce produit, on peut réaliser leur culture sans difficulté. D'autres, comme ceux de *Vitis vinifera*, se développent

pendant un certain temps sans facteur de croissance, mais on ne peut obtenir de cultures durables qu'après avoir fait agir de l'hétéroauxine sur les tissus. Les effets que produit cette substance varient avec la concentration; si l'on utilise des doses progressivement croissantes, on observe successivement une stimulation de l'activité cambiale et une activation de la division cellulaire pour des concentrations inférieures à  $10^{-7}$ , puis à partir de  $5.10^{-7}$  chez les espèces capables de produire des racines, une rhizogénèse intense; enfin, au-dessus de  $10^{-6}$ , on décèle des troubles physiologiques qui se traduisent par l'accroissement isodiamétrique des cellules et la désorganisation des tissus. Ces différentes actions ne se manifestent pas de la même manière sur toutes les plantes, car les différentes espèces sont inégalement sensibles aussi bien aux actions excitoformatrices qu'aux effets toxiques des hétéroauxines, de telle sorte qu'elles ne peuvent manifester cette action stimulante que si elle n'est pas masquée par des troubles physiologiques plus ou moins marqués suivant la sensibilité propre de l'espèce.

Ainsi, chez le Lilas, l'influence excitoformatrice de l'hétéroauxine est nette, car cette plante manifeste une grande activité cambiale et est peu sensible à l'action toxique du produit. Chez la Guimauve, au contraire, l'activité cambiale est très faible et les tissus prolifèrent peu, même en présence de fortes doses de substances de croissance. Chez d'autres espèces, comme le Tabac, l'action sur la division cellulaire existe bien, mais elle est masquée par des troubles physiologiques qui se manifestent déjà pour des teneurs relativement faibles en substances de croissance. Enfin, d'autres plantes, comme la Glycine, paraissent absolument insensibles à l'action excitoformatrice des hétéroauxines, tout au moins aux doses que nous avons utilisées. Or, nous avons remarqué que l'on ne parvient à cultiver aisément *in vitro* que les tissus des espèces sur lesquelles l'action cambio-gène se manifeste nettement comme la Vigne, le Lilas, l'Aubépine; la culture de tissus des autres espèces comme la Guimauve, le Tabac ou la Glycine est très difficile à réaliser ou même impossible.

Malgré leur grande activité, les hétéroauxines ne suffisent pas toujours à obtenir des cultures durables. Dans certains cas, nous avons dû recourir à d'autres facteurs de croissance qui n'avaient jamais encore été employés pour la culture des tissus comme le méso-inositol, la biotine et l'acide *D*-pantothénique. Certaines de ces substances comme l'acide *D*-pantothénique stimulent considérablement la prolifération des tissus, mais, faute d'expériences précises, nous ne pouvons affirmer qu'elles soient absolument indispensables à leur croissance.

Nos recherches nous ont, en outre, permis de constater qu'au cours de la culture en présence d'hétéroauxine, les tissus se modifient profondément. Leur aspect extérieur, leur consistance, leur couleur même changent peu à peu; en même temps la croissance qui était irrégulière s'améliore et devient plus homogène. Lorsque nous avons alors comparé de façon précise les réactions des tissus normaux développés sur la plante à celles de ces tissus cultivés un certain temps en présence d'hétéroauxine, nous avons constaté que ceux-ci subissent des transformations importantes. La première de ces transformations est une sensibilisation des tissus à l'hétéroauxine. Elle est caractérisée par le fait que les tissus qui l'ont subie commencent à réagir à des doses de substance de croissance de dix à cent fois plus faibles que celles auxquelles sont sensibles les tissus normaux. En outre, la prolifération des tissus sensibilisés est inhibée par des doses qui, auparavant, provoquaient un développement exubérant. Cette transformation est très rapide. Elle se produit au cours du premier passage et, chez les espèces qui la subissent, elle est très constante. Toutes les colonies cellulaires traitées présentent cette modification que l'on peut reproduire à volonté. De plus, elle apparaît avantageuse

pour les tissus qui, après l'avoir subie, prolifèrent plus régulièrement. GAUTHERET (21), en étudiant l'action de l'acide indole acétique sur les tissus de Topinambour, a constaté un phénomène de sensibilisation analogue. Mais, dans ce cas, les tissus sensibilisés, au lieu de proliférer plus régulièrement, se développaient très mal et finissaient par mourir.

La seconde transformation que nous avons rencontrée est une perte de sensibilité vis-à-vis de l'action excitoformatrice de l'hétéroauxine. Les tissus qui l'ont subie deviennent en outre capables de se développer très intensément en l'absence de ce facteur de croissance. Contrairement au précédent, ce deuxième type de transformation apparaît sporadiquement après une période de culture indéterminée. On ne peut le reproduire à volonté. Il possède un caractère local et instantané qui évoque une mutation. Cette modification paraît n'affecter tout d'abord qu'une seule cellule ou qu'un très petit groupe de cellules qui se mettent à se multiplier très activement et forment sur la culture un mamelon qui présente généralement un aspect très différent du reste du cal. Alors que les tissus normaux sont le plus souvent fermes, compacts et opaques, les tissus accoutumés deviennent fragiles, mous et translucides, ce qui permet à un observateur averti de les repérer immédiatement.

Cette seconde transformation est, elle aussi, avantageuse pour les tissus qui la subissent, car ceux-ci se développent alors plus activement et surtout plus régulièrement. C'est ainsi que ceux de certaines espèces comme la Mauve et le Tabac, ne prolifèrent bien qu'après avoir été accoutumés à l'hétéroauxine.

Les caractères des tissus accoutumés les rapprochent beaucoup de ceux des tissus de Crown-Gall. En effet, WHITE et BRAUN (80-81) ont pu montrer en étudiant des cultures de tissus de Soleil et de *Vinca rosea* que les tissus tumoraux se distinguent des tissus normaux par toute une série de caractères. Ils forment des colonies friables, translucides, capables de proliférer indéfiniment en l'absence d'hétéroauxine et sont insensibles à l'action excitoformatrice de ces substances. GAUTHERET a confirmé ces résultats sur le Topinambour. En ce cas, la différence est particulièrement accentuée, car les tissus normaux de cette espèce sont absolument incapables de se développer *in vitro* sans hétéroauxine.

WHITE et BRAUN ont, en outre, montré que les tissus tumoraux sont capables de se développer d'une façon exubérante et anarchique non seulement *in vitro* mais également *in situ*. Si l'on greffe, en effet, sur une tige normale un fragment de tissu tumoral cultivé *in vitro*, il continue à proliférer et reforme une tumeur alors que, dans les mêmes conditions, un fragment de tissu normal ne se développe pas. CAMUS et GAUTHERET (9-10) ont constaté, d'autre part, en greffant sur des fragments de racines de Scorzonère des tissus normaux accoutumés et tumoraux, que les greffons constitués par des fragments de colonies de Crown-Gall ou de tissus accoutumés s'accroissent d'une manière exubérante pour donner des sortes de tumeurs, tandis que les fragments de colonies normales ne prolifèrent que d'une manière insignifiante. Ainsi les tissus accoutumés à l'hétéroauxine ont en commun avec les tissus de Crown-Gall toute une série de propriétés tumorales, dont les plus remarquables sont : le pouvoir de proliférer sans frein *in vitro* en l'absence de substances de croissance et de former *in situ* des masses de tissus anarchiques qui échappent au contrôle de l'organisme. Nous avons nous-même pu comparer dans le cas de la Vigne, ces trois catégories de tissus : normal, tumoral et accoutumé. Ces deux derniers, c'est-à-dire le tissu tumoral et le tissu accoutumé, paraissent avoir les mêmes propriétés physiologiques et diffèrent profondément du tissu normal par le fait qu'ils prolifèrent sans frein en l'absence d'hétéroauxine et sont insensibles à son action excitoformatrice ; pourtant, leurs caractères morphologiques et anatomiques

ne paraissent pas tout à fait identiques. Les tissus accoutumés forment des masses plus transparentes, plus fragiles que les tissus tumoraux qui demeurent fermes quoique moins compacts que les tissus normaux. En outre, les tissus accoutumés sont constitués par un parenchyme entièrement homogène qui s'accroît d'une manière diffuse, tandis que l'accroissement des colonies tumorales est bien différente. La prolifération intense de ces dernières est due au reclonement actif d'une zone méristématique située à la périphérie des cals. Enfin, ces tissus ne sont pas entièrement indifférenciés, mais produisent parfois quelques îlots lignifiés. Ces caractères nous amènent à penser que, dans le cas de la Vigne, le phénomène d'accoutumance est une véritable transformation tumorale; toutefois, cette transformation n'est pas entièrement identique à celle que provoque le *Phytomonas tumefaciens*.

Nous avons songé à utiliser la facilité avec laquelle prolifèrent les tissus de Crown-Gall pour obtenir plus facilement des cultures de tissus d'espèces dont les tissus normaux se développent mal ou sont même incapables de s'accroître *in vitro*.

Nous avons ainsi isolé sans difficulté des souches de tissus de Tabac et d'Abutilon qui prolifèrent vigoureusement. Cet artifice peut donc permettre d'obtenir des cultures à partir d'espèces dont les tissus ne prolifèrent pas normalement *in vitro*. Mais il ne faut pas perdre de vue le fait que les cultures de ce type sont très différentes des tissus normaux.

Nous allons évoquer, pour terminer, les réflexions générales que nous suggère l'étude de la structure anatomique de nos cultures. Les premiers travaux de GAUTHERET (17) ont montré qu'il existe un antagonisme très net entre la croissance et la différenciation. Nos recherches confirment cette assertion. C'est ainsi que dans les cultures de Vigne, les formations très différenciées dérivant des zones génératrices apparaissent dans les régions où la croissance est peu active. De même, les cals qui se forment lentement sans hétéro-auxine sont plus différenciés que ceux qui se développent rapidement sous l'action de ce produit.

Nos observations anatomiques ont également révélé que les tissus isolés prolifèrent d'une façon très différente de ceux qui font partie d'une plante entière. Ceci n'a rien de surprenant à première vue puisqu'en les isolant on les soustrait aux phénomènes de corrélations auxquels ils sont normalement soumis. Leur structure semble alors échapper à un plan d'organisation et se présente comme particulièrement anarchique. Ils se différencient notamment d'une façon tout autre, soit en formant des zones génératrices aberrantes, des nodules libéro-ligneux plus ou moins irréguliers, ou même des groupes de cellules ligneuses isolées. Remarquons toutefois que, si presque tous les tissus cultivés *in vitro* se différencient, il existe pourtant divers degrés de différenciation. Certains tissus le sont à peine. Ils forment des masses de parenchyme homogène où l'on rencontre de très rares îlots de cellules ligneuses ou quelques nodules cribrovasculaires. Ce sont les tissus de plantes ligneuses qui présentent cette structure; par exemple celles de Lilas, d'Aubépine ou même de Vigne. Rappelons, en effet, que les énormes cals qui se forment sur les tiges de Lilas demeurent entièrement parenchymateux, alors que la plus grande partie de la plante entière est formée de bois. D'autres tissus, au contraire, se différencient notablement au cours de la culture pour former de nombreux nodules cribrovasculaires qui prennent parfois une grande extension. Ce second type de structure correspond aux tissus des plantes herbacées. Dans certains cas, comme chez les Malvacées, les formations libéro-ligneuses apparaissent très tôt et forment à elles seules la plus grande partie des cals. Il est difficile d'expliquer ce phénomène qui, à première vue, peut sembler anormal. Nous pensons qu'il est peut-être causé par l'antagonisme

qui existe entre la croissance et la différenciation. Les tissus des plantes herbacées que nous avons étudiées ont, en effet, une activité cambiale très faible et de ce fait prolifèrent lentement, ce qui peut expliquer qu'ils se différencient beaucoup lorsqu'on les cultive *in vitro*; au contraire, les tissus de plantes ligneuses ont tous une très forte activité cambiale et, comme ils se développent très rapidement *in vitro*, ils demeurent peu différenciés.

L'étude des cultures nous a également montré que les formations cribro-vasculaires qui apparaissent au cours de la différenciation des tissus cultivés *in vitro* peuvent prendre des aspects variés; chez la plupart des espèces que nous avons étudiées, elles se présentent sous la forme de nodules cribro-vasculaires plus ou moins circulaires qui apparaissent dans certains cas (Tabac, Aubépine) aussi bien dans les cals primitifs que dans les tissus repiqués. Ces nodules sont composés d'une partie centrale formée de vaisseaux aberrants généralement disposés sans ordre, entourée d'une zone génératrice circulaire qui donne naissance vers l'extérieur du nodule à des tubes criblés. Nous pouvons considérer cette disposition comme normale, puisqu'elle rappelle celle qui est réalisée dans les tiges et les racines des Dicotylédones où les massifs vasculaires sont entourés de liber. Les dimensions de ces formations sont limitées dans les cals primitifs, mais elles peuvent prendre une grande extension dans les tissus repiqués de certaines plantes comme le Muflier. Chez d'autres espèces comme la Mauve, les nodules libéro-ligneux ne se forment que dans les tissus repiqués. La structure du cal primitif produit par un fragment de tige est en effet tout autre. On y rencontre une longue zone génératrice qui, au lieu de se cycliser, se raccorde de chaque côté à la zone génératrice préexistante de la tige et produit des vaisseaux du côté des formations vasculaires préexistantes, c'est-à-dire vers l'intérieur du cal, et du liber vers l'extérieur. Lorsqu'on repique ces cals primitifs, la zone génératrice est désorganisée par la croissance des tissus; elle se fragmente en différentes parties qui se cyclisent et forment alors des nodules cribrovasculaires typiques. Ce type de structure correspond à celui que GAUTHERET a signalé dans le parenchyme vasculaire de Carotte cultivé *in vitro*.

La Vigne nous a enfin montré un troisième type de structure. Les tissus de cette espèce ne forment jamais de nodules cribrovasculaires, même au cours des repiquages successifs. Les zones génératrices ne se cyclisent jamais et sont en outre remarquables par leur orientation inversée; les vaisseaux se forment constamment sur leur face externe et les tubes criblés sur leur face interne aussi bien dans les cals primitifs que dans les cultures anciennes ayant subi de nombreux repiquages.

Signalons aussi que l'étude des trois types de tissus normaux, tumoraux et accoutumés révèle, en général, des structures anatomiques distinctes.

C'est ainsi que dans le cas de la Vigne nous avons vu que dans les tissus normaux apparaissent constamment de longues zones génératrices inversées; les cultures de tissus tumoraux de cette espèce sont constituées d'un parenchyme à grandes cellules à la périphérie duquel on rencontre une région formée de plusieurs assises cellulaires en voie de multiplication intense. Ce parenchyme est presque entièrement homogène et ne renferme que quelques rares îlots de cellules ligneuses. Enfin les tissus accoutumés sont formés d'un parenchyme entièrement homogène ne se différenciant jamais. C'est d'ailleurs le seul exemple connu de culture de parenchyme à l'état pur. Si on le cultive en présence d'hétéroauxine à faible concentration ( $5.10^{-8}$ ), ses cellules présentent une tendance marquée à s'arrondir et à se séparer les unes des autres. Les cultures présentent alors la consistance d'une purée qui s'étale à la surface du milieu. Elles demeurent cependant vivantes et l'on peut repiquer aisément ces tissus en prélevant avec la pointe

d'un scalpel un peu de cette gelée que l'on porte sur un milieu neuf où elle continue à s'accroître. Nous pensons qu'il y a peut-être là une voie nouvelle permettant de réaliser la culture de cellules isolées de plantes supérieures.

Dans le cas du Tabac, les tissus normaux s'accroissent d'une manière diffuse par la multiplication des cellules indifférenciées des parenchymes qui les composent. Ces tissus renferment de très nombreux nodules cribro-vasculaires qui s'étendent très peu. Les tissus tumoraux ont une structure analogue, mais ils sont moins différenciés et les éléments ligneux qu'on y observe n'y sont pas associés à des tubes criblés; on n'y rencontre donc pas de formations cribro-vasculaires, mais uniquement des vaisseaux aberrants. Les tissus accoutumés ont une structure intermédiaire, ils sont moins différenciés que les tissus normaux, on y rencontre de véritables formations cribro-vasculaires; mais les éléments criblés y sont plus rares que dans les cultures de tissus normaux.

Dans le cas de la Vigne-vierge et de la Mauve nous n'avons pu comparer que la structure des tissus normaux et accoutumés et nous avons pu constater qu'elles différaient profondément.

Les tissus des colonies normales sont composés d'un parenchyme régulier renfermant des formations cribro-vasculaires. Ce parenchyme prolifère lentement et d'une façon diffuse; au contraire les colonies qui ont subi le phénomène d'accoutumance renferment beaucoup moins de formations cribro-vasculaires et s'accroissent d'une manière très différente; on distingue en effet dans les régions indifférenciées du parenchyme des plages en voie de multiplication active. Ces plages s'accroissent indépendamment les unes des autres et forment des amas de nodules sans cohésion qui se séparent les unes des autres, ce qui donne aux colonies de Vigne-vierge ou de Mauve une consistance friable.

Ainsi il n'existe pas de structure caractéristique de chacune des trois catégories de tissus, normaux, tumoraux et accoutumés. Mais pour chaque espèce chacune de ces trois catégories présente une structure et un mode de croissance spécial.

B. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA CULTURE DES PARASITES OBLIGATOIRES. — 1° *Cultures de champignons parasites.* — Comme toutes les sciences biologiques, la pathologie végétale est demeurée très longtemps une science d'observation. Les premiers auteurs qui ont étudié les maladies des plantes se sont en effet contentés de décrire les organismes parasites, de les classer et d'enregistrer les lésions qu'ils produisent. A ce stade purement descriptif a succédé une étude plus approfondie faisant appel à des méthodes expérimentales. On a alors tenté de connaître le mode de reproduction des champignons parasites, leur cycle végétatif; plus tard encore les phyto pathologistes ont étudié les conditions de propagation des maladies et cherché à les enrayer par des moyens très empiriques. Puis, tout récemment, ils ont enfin essayé d'étudier les relations physiologiques qui s'établissent entre le parasite et l'hôte. Ces relations sont plus ou moins étroites. Certains comme les *Botrytis* ou les *Fusarium* ne sont pas nécessairement parasites. On les rencontre non seulement sur des plantes vivantes qu'ils tuent en sécrétant des substances toxiques, mais encore sur n'importe quels débris végétaux où ils vivent en saprophytes. D'autres, plus spécialisés, comme le Mildiou de la Pomme de terre, les Tavelures des arbres fruitiers, les Ustilaginales, ne se rencontrent que sur des espèces bien déterminées, et non sur des débris désorganisés, mais sont néanmoins capables de se développer à partir de substances inertes convenablement choisies, si bien qu'on peut les cultiver *in vitro* sur des milieux analogues à ceux que l'on emploie pour les espèces purement saprophytes.

En ce cas, si l'on examine de près la nature de ces relations, on remarque que le développement d'un parasite sur une plante exige que celle-ci le tolère et qu'elle lui fournisse en outre les éléments nécessaires à la croissance.

Ainsi, la Tavelure du Poirier n'attaque que le Poirier. Elle est incapable de se développer sur des genres très voisins comme le Pommier ou le Cerisier, parce que ces plantes se défendent par un mécanisme humoral. Néanmoins, ces espèces possèdent toutes les substances nutritives nécessaires au développement de ce champignon, car il suffit de l'ensemencer sur un jus de pommes ou de cerises pour le voir croître vigoureusement.

Enfin ces relations peuvent devenir, quelquefois, tellement étroites, que non seulement le parasite n'attaque que des végétaux appartenant à une seule espèce ou à un seul genre, mais qu'il lui est même impossible de se développer en dehors des tissus vivants de ces plantes. Il peut paraître singulier que le parasite ne puisse trouver dans les cellules mortes les éléments nutritifs qu'il puise normalement dans les cellules vivantes; pour expliquer ce phénomène on peut envisager plusieurs hypothèses. L'arrêt de croissance du parasite au moment de la mort de la plante hôte peut être due à une modification de la constitution chimique des cellules au moment de leur mort, modification qui provoquerait la formation de substances toxiques pour le champignon. Cet arrêt de croissance serait alors dû à un phénomène d'inhibition comparable à celui qui cause la mort d'un tissu végétal lorsqu'on le met en présence d'un extrait de plante quelconque ou même en certains cas d'une substance protéique comme la peptone. Si cette hypothèse est exacte, on ne peut espérer réaliser sa culture sur des milieux naturels, mais uniquement sur des milieux synthétiques. Mais il est plus vraisemblable d'attribuer cet arrêt de développement à un trouble de nutrition. La prolifération du mycélium peut nécessiter des substances de croissance contenues dans les tissus vivants, mais se détruisant rapidement après leur mort. Par exemple des produits intermédiaires du métabolisme cellulaire qui disparaissent quand celui-ci cesse. En ce cas, sa culture deviendra possible quand nos connaissances de la biochimie de la cellule permettront l'isolement de ces substances. Enfin le parasite peut avoir besoin comme support du milieu colloïdal spécial qu'il trouve dans le protoplasme, et, en ce cas, il n'y aurait que peu d'espoir de pouvoir le cultiver en dehors des tissus vivants.

La spécificité des Urédinées hétéroïques pose un problème spécial. Pour expliquer que la même espèce ne puisse se développer que sur deux hôtes souvent très différents comme un Gymnosperme et une Dicotylédone, ou une Monocotylédone et une Dicotylédone, il faut admettre soit que les deux phases du cycle végétatif ont un métabolisme très différent, soit que les deux hôtes possèdent un caractère commun qui nous échappe. Ce caractère peut être, soit une déficience du mécanisme de défense humorale commun à deux plantes, soit la réalisation d'un mode de nutrition propre au champignon chez ces deux espèces.

Après avoir ainsi évoqué quelques idées générales relatives aux possibilités de cultiver des champignons strictement adaptés à la vie parasitaire, nous allons rappeler les résultats de nos essais de culture. La technique des cultures associées de tissus et de champignons parasites nous a permis d'obtenir la culture *in vitro* de deux espèces, le Mildiou et l'Oïdium de la Vigne. Ce résultat a été pénible à obtenir. Les difficultés que nous avons rencontrées provenaient tout d'abord de l'obtention aseptique des spores du parasite et ensuite de l'infection des cultures par ces spores. Il est en effet relativement facile d'isoler une espèce saprophyte, car le mycélium se développant avec vigueur sur

des milieux artificiels peut servir de point de départ à des cultures. Il suffit souvent de le prélever aseptiquement dans les parties profondes des tissus; lorsque cela est impossible, on a toujours la ressource d'ensemencer des spores et, si l'on n'obtient pas immédiatement des cultures pures, on peut, par des repiquages successifs, éliminer les impuretés qui contaminent le milieu. Il n'en est pas de même avec des tissus cultivés *in vitro*. La moindre spore de champignon saprophyte, la moindre bactérie se développe sur la gélose et les tissus ne tardent pas à être tués. Il devient impossible de les éliminer, d'où la nécessité absolue de partir d'un matériel non contaminé. Cette difficulté n'est cependant pas la principale, car nous avons montré dans chaque cas particulier que l'on pouvait, par divers artifices, prélever aseptiquement des spores; toutefois, il n'existe aucune méthode vraiment générale.

L'infection des tissus est plus délicate à réaliser. Il semble que le Mildiou et l'Oïdium de la Vigne pénètrent plus difficilement à l'intérieur des tissus peu différenciés comme ceux que l'on obtient en culture que sur des organes comme les feuilles ou les tiges.

Ces difficultés sont plus grandes encore avec les Urédinées et expliquent les échecs que nous avons rencontrés. Ils ne sont pas dus, croyons-nous, à une impossibilité pour le champignon de se développer à l'intérieur des tissus cultivés *in vitro*, mais plutôt à un mauvais mode opératoire. Dans tous les cas, les échecs provenaient de notre ignorance du mode d'inoculation naturel. Ils ne sont d'ailleurs pas définitifs, car les circonstances de nos échecs nous ont, au contraire, suggéré des moyens de parvenir à de meilleurs résultats. Nous pensons qu'une solution relativement facile de la culture des Urédinées consisterait à faire des cultures à partir d'organes déjà contaminés, porteurs d'une infection à l'état latent. Cette méthode n'est évidemment pas applicable dans tous les cas, car le thalle de beaucoup d'espèces est très petit et n'apparaît souvent que dans des régions spécialisées dont les tissus ne peuvent être cultivés, comme c'est le cas pour les feuilles. Parfois, cependant, l'infection peut se généraliser à toute la plante et dans ce cas la culture de tissus permettrait sans doute d'obtenir *in vitro* le développement d'Urédinales, de suivre la formation de leurs appareils reproducteurs si variés et d'en étudier le déterminisme.

2° *Cultures des Virus*. — Le problème posé par la culture des virus est très différent de celui que nous venons d'évoquer à propos de la culture des champignons parasites obligatoires: si l'on peut en effet malgré tout espérer réaliser la culture de ces derniers sur des milieux inertes, il n'en est pas de même pour les agents pathogènes. Il est évidemment impossible de concevoir leur multiplication en dehors de la cellule vivante puisqu'ils ne sont pas à proprement parler des êtres vivants, mais plutôt des substances dérivant d'une déviation du métabolisme. On peut tout au plus espérer en réaliser la synthèse si toutefois on en découvre qui possèdent une structure plus simple que ceux que l'on connaît actuellement. Nous avons montré que la technique des cultures de tissus permet de cultiver au laboratoire certains virus et indiqué les avantages matériels de ces cultures. Nous ne considérons pas cependant la réalisation de ces cultures comme le but définitif de nos recherches. Nous y voyons plutôt un moyen d'investigation nouveau pour étudier ces agents pathogènes. Sur aucune de nos cultures nous n'avons observé les symptômes caractéristiques de la maladie et, dans chaque cas nous étions obligé de recourir à des inoculations pour contrôler la présence du virus. La croissance des colonies ne paraissait pas non plus être affectée par le parasite. Ceci semble dû au fait que les virus que nous avons étudiés ne causent au Tabac que des lésions bénignes. Nous pensons qu'il y aurait lieu d'étudier sur d'autres plantes

l'action de virus provoquant des troubles plus graves, tels que des nécroses locales ou un ralentissement prononcé de la croissance.

Enfin, les cultures de tissus qui sont toujours réalisées en milieu entièrement synthétique constituent un matériel de choix pour l'étude de la formation de ces protéines si spéciales. Il doit être possible d'en étudier la synthèse *in vitro* en fonction de la nutrition des tissus et d'envisager également l'action de substances bien définies telles que celles qui constituent leur molécule sur leur synthèse.

La culture du virus de la Mosaïque du Tabac nous a montré une diminution considérable de la multiplication de cet agent pathogène dans les tissus tumoraux et accoutumés. Pour expliquer que les tissus de Crown-Gall ou ceux qui ont subi le phénomène d'accoutumance renferment de trente à quarante fois moins de virus que les tissus de la plante entière, nous avons tout d'abord imaginé que l'auxine normalement contenue dans les tissus pouvait troubler la synthèse du virus. On a reconnu en effet que les tissus tumoraux et accoutumés synthétisent davantage d'auxine que les tissus normaux. Mais, cette hypothèse nous paraît cependant fragile, car les recherches d'AVERY ont montré que les feuilles de Tabac sain contiennent des quantités importantes d'auxine.

On peut également admettre que cette faible teneur des tissus tumoraux et accoutumés en virus est provoquée par la rapidité avec laquelle ceux-ci prolifèrent. Dans les tissus cultivés *in vitro*, comme dans la plante entière, il y a en effet un antagonisme entre la prolifération des cellules et leur pouvoir d'élaboration. Les tissus méristématiques en voie de multiplication active produisent peu de métabolites ou de produits d'excrétion. Les colonies tissulaires qui s'accroissent activement élaborent également très peu de ces substances. Si le virus, comme on l'admet souvent, est un produit d'élaboration de la cellule, on conçoit que les tissus tumoraux et accoutumés qui se développent d'une façon exubérante n'en élaborent que très peu. Ces hypothèses sont toutefois provisoires et nécessitent, pour être vérifiées ou infirmées, de nouvelles recherches expérimentales, que nous nous proposons d'entreprendre sans tarder.

C. CONCLUSIONS. — Arrivé au terme de cet exposé, il nous paraît utile de mettre en relief les principaux résultats que nous avons obtenus au cours de notre travail. Ceux-ci peuvent se résumer de la manière suivante :

1° Des fragments de tiges de diverses Lianes de la famille des Ampélidées (*Vitis*, *Parthenocissus*, *Cissus*) et des Rosacées (*Rubus*) ensemencés dans des milieux synthétiques composés d'une solution minérale glucosée solidifiée par de la gélose et renfermant en outre diverses substances de croissance (cystéine, aneurine et hétéroauxine) proliféraient activement pour former des cals volumineux; toutefois, les tissus d'autres lianes (*Wisteria*, *Clematis*, *Hedera*), ne se développent pas dans ces conditions.

La croissance *in vitro* de fragments de tiges de la plupart de ces lianes (*Vitis*) présente une polarité très nette se manifestant par le fait que, seule, l'extrémité radicale des explantats se développe; les tissus d'autres espèces (*Parthenocissus*) paraissent dépourvus de cette propriété. La structure anatomique des néoformations est très variée; dans certains cas (*Rubus*) le cal demeure indifférencié; dans d'autres cas (*Cissus*) il renferme des nodules cribrovasculaires. Enfin, à la périphérie des néoformations produites par les tiges de *Vitis* apparaissent de longues zones génératrices qui ont une orientation inversée et produisent des vaisseaux vers l'extérieur et du liber vers l'intérieur du cal.

2° Des fragments de tissu cambial ou des tronçons de tiges de divers arbres : *Cra-*

*taegus*, *Pyrus*, *Syringa*, se développent dans les mêmes conditions en produisant des formations analogues à celles que nous avons observées sur des tiges de Lianes. Les tiges de ces espèces présentant une polarité très nette et les néoformations obtenues *in vitro* sont très peu différenciées.

3° Des fragments de tiges aériennes de diverses plantes herbacées, *Antirrhinum*, *Malva*, *Althea*, *Nicotiana*, ensemencés sur le même milieu, prolifèrent également très vigoureusement. Les tiges de toutes ces plantes possèdent aussi une polarité très accentuée. Mais le parenchyme des cals qu'elles produisent se différencie très tôt; on y observe soit de longues zones génératrices raccordées à la zone génératrice normale de la tige et formant des vaisseaux à l'intérieur du cal du côté du bois préexistant et du libervers l'extérieur (*Malva*), soit de nombreux nodules cribro-vasculaires (*Nicotiana*).

4° Nous avons observé que, lorsqu'on repique les cals obtenus en cultivant *in vitro* des fragments de tiges de ces trois catégories de végétaux : lianes, plantes ligneuses, et plantes herbacées, sur des milieux renfermant de l'hétéroauxine, ils continuent à se développer et paraissent capables de proliférer d'une manière indéfinie. Nous avons pu ainsi isoler des souches de cultures de tissus de divers *Vitis*, *Parthenocissus*, *Rubus*, de *Crataegus monogyna*, *Pyrus communis*, *Syringa vulgaris*, *Antirrhinum majus*, *Malva sylvestris*, divers *Althea* et *Nicotiana Tabacum*.

5° L'étude de l'action de l'hétéroauxine sur les tissus de *Vitis vinifera* et de *Parthenocissus tricuspidata* nous a permis de montrer qu'en présence de cette substance à concentration convenable ceux-ci subissaient successivement deux types de transformations : la première est caractérisée par le fait que les cellules deviennent capables de proliférer faiblement mais indéfiniment sans hétéroauxine en même temps qu'elles manifestent une exaltation de leur sensibilité vis-à-vis de cette substance. La seconde transformation consiste dans le fait que les cellules deviennent capables de se multiplier très intensément, même en l'absence d'hétéroauxine, mais perdent leur sensibilité vis-à-vis de l'action excitoformatrice de ce produit; cette seconde transformation est accompagnée de modifications morphologiques et anatomiques très caractéristiques; elle est analogue au phénomène décrit par GAUTHERET sur les tissus de Carotte et de Scorsonère sous le nom d'accoutumance à l'hétéroauxine. Les tissus de *Malva sylvestris* et *Nicotiana tabacum* subissent également cette seconde transformation et leur culture qui était très délicate à réaliser devient alors beaucoup plus facile.

6° Nous avons mis en évidence l'action excitoformatrice de l'acide *d*-pantothénique de la biotine et de l'inositol sur les tissus de *Crataegus monogyna* et *Pyrus communis*.

7° Nous avons réalisé des cultures de tissus de Crown Gall de *Vitis vinifera*, *Nicotiana tabacum* et *Abutilon avicennae*. Nous avons constaté qu'ils prolifèrent vigoureusement *in vitro* en l'absence d'hétéroauxine et possèdent un certain nombre de caractères qui les rapprochent beaucoup des tissus ayant subi le phénomène d'accoutumance.

8° Nous avons pu inoculer le *Plasmopara viticola* et l'*Uncinula necator* aux tissus de Vigne cultivés *in vitro* et réalisé ainsi pour la première fois la culture de ces parasites.

9° Nous avons cultivé des tissus de *Nicotiana tabacum* atteints par le Virus de la Mosaïque du Tabac, le virus X et le virus Y de la Pomme de terre. Nous avons également pu inoculer ces virus à des tissus de Tabac sain cultivés *in vitro* et constaté que les virus se multiplient dans les tissus.

10° Nous avons enfin dosé la quantité de virus contenue dans des cultures de tissus

accoutumés à l'hétéroauxine et dans des tissus de Crown-Gall de *Nicotiana Tabacum*. Nous avons ainsi constaté que la quantité de virus que contiennent les tissus accoutumés et tumoraux est d'environ 30 à 40 fois plus faible que celle des feuilles de la plante entière.

# BIBLIOGRAPHIE.

1. ARONESCU-SAVULESCU (A.). — Contribuțiuni la studiul ruginii de pe gura Leului (*Puccinia Antirrhini* Diet et Hollway). [*Anal. Inst. Cerc. Agron. Rom.*, 10, 473-517, 1940.]
2. AUGIER DE MONTGREMIER (H.), LIMASSET (P.) et MOREL (G.). — Sur le maintien d'une maladie à virus complexe dans des tissus de Tabac cultivés *in vitro*. (*C. R. Ac. Sc.*, 227, 606-608, 1948.)
3. AUGIER DE MONTGREMIER (H.) et MOREL (G.). — Sur la diminution de la teneur en virus (*Marmor Tabaci* Holmès) de tissus de Tabac cultivés *in vitro*. (*C. R. Ac. Sc.*, 227, 688-689, 1948.)
4. BAWDEN (F. C.) et PIRIE (N. W.). — Crystalline preparations of tomato bushy stunt virus. (*Brit. J. Exp. Path.* 19, 251-263, 1938.)
5. BEIJERINCK (M. W.). — Ueber ein *contagium vivum fluidum* als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. (*Verh. Akad. Wet. Amst.* 6, 1-22, 1898.)
6. BOBILIOFF-PREISSER (W.). — Beobachtungen an isolierten Palissaden und Schwamparenchymzellen. (*Beih. Z. Bot. Zbl.* 3, 248-274, 1917.)
7. BÜRGER (H.). — Ueber die Kultur von isolierten Zellen und Gewebefragmenten. (*Arch. f. exp. Zellf.*, 2, 123-190, 1926.)
8. CAMUS (G.) et GAUTHERET (R. J.). — Sur la transmission par greffage des propriétés tumorales des tissus de Crown-gall. (*C. R. Soc. Biol.*, 142, 15-16, 1948.)
9. CAMUS (G.) et GAUTHERET (R. J.). — Sur le caractère tumoral des tissus de Scorsonère ayant subi le phénomène d'accoutumance aux hétéroauxines. (*C. R. Acad. Sc.*, 226, 744-745, 1948.)
10. CAMUS (G.) et GAUTHERET (R. J.). — Nouvelles recherches sur le greffage des tissus normaux et tumoraux sur des fragments de racine de Scorsonère cultivés *in vitro*. (*C. R. Soc. Biol.*, 1942, 769-771, 1948.)
11. CAMUS (G.) et GAUTHERET (R. J.). — Sur le repiquage des proliférations induites sur des fragments de racines de Scorsonère par des tissus de Crown-gall et des tissus ayant subi le phénomène d'accoutumance aux hétéroauxines. (*C. R. Soc. Biol.*, 142, 771-773, 1948.)
12. CRACIUN (E.). — La culture des tissus en Biologie expérimentale. (Paris, Masson, 1931.)
13. CZECH (H.). — Kultur von pflanzlichen Gewebezellen. (*Arch. f. exp. Zellf.*, 3, 176-199, 1926.)
14. FIEDLER (H.). — Die pflanzliche Gewebe und Organkultur. (*Z. Bot.*, 55, 369-416, 1938.)
15. GAUTHERET (R. J.). — Culture du tissu cambial. (*C. R. Ac. Sc.*, 198, 2195, 1934.)
16. GAUTHERET (R. J.). — Recherches sur la culture des tissus végétaux, essais de culture de quelques tissus méristématiques. (*Thèse Sciences*, 279, Paris, 1935.)
17. GAUTHERET (R. J.). — La culture des tissus végétaux, son état actuel, comparaison avec la culture des tissus animaux. (Paris, Hermann, 60, 1937.)
18. GAUTHERET (R. J.). — Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercule de Carotte. (*C. R. Ac. Sc.*, 208, 218, 1939.)
19. GAUTHERET (R. J.). — Sur le repiquage des cultures de tissus d'Endive, de Salsifis et de Topinambour. (*C. R. Ac. Sc.*, 213-231, 1941.)
20. GAUTHERET (R. J.). — Manuel technique de culture des tissus végétaux. (Paris, Masson, 1942.)

21. GAUTHERET (R. J.). — Hétéroauxines et cultures de tissus végétaux. (*Bull. Soc. chim. biol.*, 24, 13-48, 1942.)
22. GAUTHERET (R. J.). — Recherches sur le développement de fragments de tissus végétaux cultivés *in vitro*. (*Rev. cytol. et cytophysiol.*, 6, 85-180, 1942-1943.)
23. GAUTHERET (R. J.). — Une voie nouvelle en biologie végétale. La culture des tissus. (202p, Paris, Gallimard, 1945.)
24. GAUTHERET (R. J.). — Comparaison entre la structure des cultures de tissus normaux et des cultures de tissus de Crown-gall de topinambour. (*C. R. Soc. biol.*, 141, 598-601, 1947.)
25. GAUTHERET (R. J.). — Action de l'acide indole-acétique sur le développement des tissus normaux et des tissus de Crown-gall de Topinambour cultivés *in vitro*. (*C. R. Ac. Sc.*, 224, 1728-1730, 1947.)
26. GAUTHERET (R. J.). — Sur la culture des trois types de tissus de Scorsonère : tissus normaux, tissus de Crown-gall et tissus accoutumés à l'hétéroauxine. (*C. R. Ac. Sc.*, 226, 270-271, 1948.)
27. GAUTHERET (R. J.). — Action de l'acide indole-acétique sur le développement de trois types de tissus de Scorsonère : tissus normaux, tissus de Crown-gall et tissus accoutumés à l'hétéroauxine. (*C. R. Soc. Biol.*, 142, 774-775, 1948.)
28. GAUTHERET (R. J.). — Sur la culture indéfinie des tissus de *Salix Caprea*. (*C. R. Soc. Biol.*, 142, 807-808, 1948.)
29. GAUTHERET (R. J.). — Sur la croissance de trois types de tissus de Scorsonère : tissus normaux, tissus de Crown-gall et tissus accoutumés à l'hétéroauxine. (*C. R. Ac. Sc.*, 226, 270-271, 1948.)
30. HABERLANDT (G.). — Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen (*Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien Math-Natur. Kl.*, 111, 69-92, 1902.)
31. HABERLANDT (G.). — Über Zellteilungshormone und ihre Beziehungen zur Wundheilung, Befruchtung, Parthenogenesis und Adventivembryonie. (*Biol. Zbl.*, 42, 145-172, 1922.)
32. IWANOWSKY (D.). — Ueber die Mosaik-Krankheit der Tabak Pflanze. (*Zeit. Pflanzenkrank.*, 13, 1-41, 1903.)
33. JACQUIOT (C.). — Effet inhibiteur des tannins sur le développement *in vitro* du cambium de certains arbres forestiers. (*C. R. Acad. Sc.*, 225, 434-446, 1947.)
34. KNUDSON (L.). — Viability of detached root cap cells. (*Amer. Journ. Bot.*, 6, 309-310, 1919.)
35. KOTTE (W.). — Wurzelmeristem in Gewebe-Kultur. (*Ber. dtsch. Bot. ges.*, 40, 269-272, 1922.)
36. KÖGL (F.) et FRIES (N.). — Ueber den Einfluss von Biotin Aneurin und Mesoinosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. (*Hoppe Seyler's Zeit. f. Physiol. Chem.*, 242, 93-110, 1937.)
37. KULESCHA (Z.) et GAUTHERET (R. J.). — Sur l'élaboration de substances de croissance par trois types de cultures de tissus de Scorsonère : cultures normales, cultures de Crown-gall et cultures accoutumées à l'hétéroauxine. (*C. R. Acad. Sc.*, 227, 292-294, 1948.)
38. KÜSTER (E.). — Das Verhalten pflanzlichen Zellen *in vitro* und *in vivo*. (*Arch. f. exp. Zellf.*, 6, 28-41, 1928.)
39. LAMPRECHT (W.). — Ueber die Kultur und Transplantation kleiner Blattstücken. (*Beitr. z. Allg. Bot.*, 353-398, 1918.)
40. LIESKE (P.). — Untersuchungen über die als Mauke oder Grind bezeichnete Erkrankung der Weinreben. (*Arb. d. Biol. Reichsanst. f. Land-u. Forstw.*, 15, 261-270, 1927.)
41. LEK (H. A. A. VAN DER) et KRYTHE (E.). — Over het stekke van sering met toepassing van groeistof. (*Mededeel. van den tuinbouw-voort.*, 35, 35 p., 1943.)
42. LIMASSET (P.) et AUGIER DE MONTGREMIER (H.). — Sur une maladie à virus provoquant des déformations foliaires remarquables chez le Tabac et la Tomate. (*Ann. des Epiph.*, 12, 181-202, 1946.)
43. LIMASSET (P.) et AUGIER DE MONTGREMIER (H.). — Sur une méthode de dosage des virus des Plantes. (*C. R. Acad. Sc.*, 225, 1176-1177, 1947.)

44. MC. CALLAN (S. E. A.). — Evaluating fungicides by means of greenhouse Snapdragon rust. (*Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 13, 367-383, 1944.)
45. MC. CALLAN (S. E. A.) et WILCOXON (F.). — An analysis of factors causing variation in spore germination tests of fungicides. I. Methods of obtaining spores. (*Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 11, 5-20, 1939.)
46. MOREL (G.). — Sur le développement des tissus de Vigne cultivés *in vitro*. (*C. R. Soc. Biol.* 138, 62, 1944.)
47. MOREL (G.). — Action de l'acide indole  $\beta$ -acétique sur la croissance des tissus de Vigne (*C. R. Soc. Biol.* 138, 93, 1944.)
48. MOREL (G.). — Le développement du mildiou sur les tissus de Vigne cultivés *in vitro* (*C. R. Ac. Sc.* 218, 50-52, 1944.)
49. MOREL (G.). — Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de Vigne (*C. R. Ac. Sc.* 229, 36-37, 1944.)
50. MOREL (G.). — Recherches sur le développement de fragments de lianes cultivés *in vitro*. (*Bull. Soc. Bot.*, 92, 98-102, 1945.)
51. MOREL (G.). — Isolement de cultures pures de Parenchyme de Vigne (*C. R. Ac. Sc.* 221, 78-80, 1945.)
52. MOREL (G.). — Caractères anatomiques des tissus de Vigne cultivés *in vitro*. (*C. R. Soc. Biol.*, 139, 674, 1945.)
53. MOREL (G.). — Remarques sur l'action de l'acide naphthyle acétique sur le développement des tissus de Vigne. (*C. R. Soc. Biol.* 140, 269-270, 1946.)
54. MOREL (G.). — Action de l'acide pantothénique sur la croissance des tissus d'Aubépine cultivés *in vitro* (*C. R. Ac. Sc.*, 223, 166-168, 1946.)
55. MOREL (G.). — Transformations des Cultures de tissus de Vigne produites par l'hétéroauxine. (*C. R. Soc. Biol.* 141, 280-282, 1947.)
56. MOREL (G.) et GAUTHERET (R.-J.). — Pathologie Végétale et culture des tissus. (*Rev. Scient.* 85, 649-669, 1948.)
57. NIEMEYER (L.). — Die durch *Pseudomonas tumefaciens* (SMITH, TOWN.) Stewens. Verursachte Mauke der Weinreben. (*Centralbl. f. Bakt. Paras. u. Infektions-Krankh.*, 92, II, 116-162, 1935.)
58. NOBECOURT (P.). — Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. (*C. R. Soc. Biol. Paris*, 130, 1270, 1939.)
59. NOBECOURT (P.). — La culture des tissus et organes végétaux. (*Rev. Scient.*, 81, 161-170, 1943.)
60. NOBECOURT (P.) et KOEFLER (L.). — Culture de tissus de tige de Rosier. (*C. R. Acad. Sc.*, 222, 817, 1945.)
61. PFEIFFER (H.). — Beobachtungen an Kulturen nackter Zellen aus pflanzlichen Beerenperikarprien. (*Arch. f. Exp. zellf.*, 11, 424, 1931.)
62. RAVAZ (L.). — Le Mildiou in *Traité général de Viticulture*. (Paris, Masson, 1914. P. 197.)
63. ROBBINS (W. J.). — Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. (*Bot. gaz.*, 73, 59-79, 1922.)
64. ROPP (R. S. DE). — The growth promoting and tumefacient factors of Bacteria free Crown-Gall tumor tissue. (*Amer. Journ. Bot.*, 34, 1947, p. 248-261.)
65. SCHMÜCKER (T.). — Isolierte Gewebe und Zellen von Blütenpflanzen (*Planta*, 9, 339-340, 1929.)
66. SCHOPFER (W. H.). — Vitamines et facteurs de croissance chez les plantes. Contribution à l'étude quantitative des conditions d'action des facteurs de croissance sur *Phycomyces Blakesleeanus* (*Arch. f. Mikrob.*, 6, 510-531, 1935.)
67. SEGRETAIN (G.). — Culture d'un virus et son inoculation sur des fragments de tiges de Tabac cultivés *in vitro*. (*Ann. Inst. Pasteur*, 69, 1943, p. 61-63.)

68. SEGRETAIN (G.). — Virus et cultures de tissus de Tabac et de Tomate. (*C. R. Acad. Sc.*, 226, 594-595, 1948.)
69. STANLEY (W. M.). — Isolation of a cristalline proteine possessing properties of Tobacco mosaic virus. (*Science*, 81, 644, 1935.)
70. SMITH (E. F.), BROWN (N. A.) et TOWNSEND (C. O.). — Crown-Gall of plants, its cause and remedy. (*U. S. Depart. Agr. Bur. Plant Ind. Bull.*, 213, 1-215, 1911.)
71. TELLE (I.) et GAUTHERET (R. J.). — Sur la culture indéfinie des tissus de Jusquiame *Hyoscyamus niger* L. (*C. R. Acad. Sc.*, 224, 1653-1654, 1947.)
72. UHLEHLA (V.). — Vorversuche zur Kultur des Pflanzengewebes. I. Das Wasser als Factor der Gewebekultur. *Arch. f. exp. Zellf.*, 6, 370-417, 1918.)
73. WHITE (P. R.). — Plant tissue cultures. The history and present status of the problem. (*Arch. f. exp. Zellf.*, 10, 501-538, 1931.)
74. WHITE (P. R.). — Potentially unlimited growth of excised Tomato root tips in a liquid medium. (*Plant Physiol.*, 9, 585-600, 1934.)
75. WHITE (P. R.). — Multiplication of the Viruses of Tobacco and Aucuba mosaic in growing excised Tomato roots. (*Phytopath.*, 24, 1003-1011, 1934.)
76. WHITE (P. R.). — Plant tissue cultures. (*Bot. Rev.*, 2, 419-436, 1936.)
77. WHITE (P. R.). — Potentially unlimited Growth of excised plant callus in an artificial nutrient. (*Ann. Journ. Bot.*, 26, 59-64, 1939.)
78. WHITE (P. R.). — Plant tissue culture. (*Biol. Rev.*, 16-34, 1941.)
79. WHITE (P. R.). — A handbook of plant tissue culture. (*The J. Cattell Press.*, Lancaster, 1943, 277 p.)
80. WHITE (P. R.). — Metastatic (Graft) tumor of bacteria free Crown-Gall on *Vinca rosea*. (*Amer. Journ. Bot.*, 32, 237-241, 1945.)
81. WHITE (P. R.) et BRAUN (C.). — A cancerous neoplasm of plants. (*Cancer research*, 2, 597-617, 1942.)
82. WILCOXON (F.) et Mc CALLAN (S. E. A.). — The stimulation of fungous spore germination by aqueous plant extract. (*Phytopath.*, 24, p. 20, 1934.)
83. YARWOOD (C. R.). — Detached leaf culture. (*Bot. Rev.*, 12, 1-56, 1946.)
84. ZIMMERMAN (P. W.) et HITCHCOCK (A. E.). — Adventitious shoots and roots induced by natural influences and synthetic growth substances. (*Contr. Boyce Thompson Inst.*, 11, 122-127, 1940.)



